

**GIORGIO ALFREDO PEDROSO BARETTA**

**EFEITO DA CICLOSPORINA NA REGENERAÇÃO HEPÁTICA EM  
RATOS SUBMETIDOS À HEPATECTOMIA PARCIAL**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.**

**Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias**

**Coordenador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos**

**CURITIBA**

**2009**

Baretta, Giorgio Alfredo Pedroso

Efeito da ciclosporina na regeneração hepática em ratos  
submetidos à hepatectomia parcial / Giorgio Alfredo Pedroso

Baretta. – Curitiba, 2009.

96 f. il. color.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias.

Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Setor de Ciências  
Saúde, Universidade Federal do Paraná.


1.Regeneração hepática. 2.Ciclosporina. 3.Hepatectomia.  
4.Transplante hepático. I.Título. NLM: WI 770



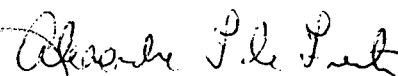
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEIS: MESTRADO E DOUTORADO

Ata do julgamento da 334<sup>a</sup> dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **Giorgio Alfredo Pedroso Baretta** com o título Efeito da Ciclosporina na Regeneração Hepática em Ratos Submetidos à Hepatectomia Parcial, na **Linha de Pesquisa:** Avaliação Anátomo-Funcional dos Transplantes de Órgãos Sólidos e Tecidos na **Área de Concentração:** Clínica Cirúrgica tendo como orientador Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias.


Às sete horas e trinta minutos do dia vinte de fevereiro de dois mil e nove, no auditório do 7º andar do prédio central sala 701 do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos Professores Doutores José Luiz de Godoy, Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas e Júlio Cezar Uili Coelho sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos, Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da dissertação como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua dissertação no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. O candidato foi considerado **APROVADO** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que será assinada pelos seguintes componentes da Banca Examinadora de Avaliação.



José Luiz de Godoy



Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas



Júlio Cezar Uili Coelho



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA  
DA AVALIAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aluno **Giorgio Alfredo Pedroso Baretta**

Título da Dissertação: Efeito da Ciclosporina na Regeneração Hepática  
em Ratos Submetidos à Hepatectomia Parcial

**CONCEITOS EMITIDOS:**

Prof.Dr. José Luiz de Godoy	conceito emitido A	equivalência 10
Prof.Dr. Alexandre C. Teixeira de Freitas	conceito emitido A	equivalência 10
Prof.Dr. Júlio Cezar Uili Coelho	conceito emitido A	equivalência 10

**Conceito Final de Avaliação:**

Conceito: A Equivalência: 10

Curitiba, 20 de fevereiro de 2009.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Luiz de Godoy

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Júlio Cezar Uili Coelho

Aos meus pais, Juventino e Nedir, e aos meus irmãos, Carla e Rodrigo.

O amor imenso que nos une supera a distância que nos separa.

Pela vida, pelo apoio e principalmente pela amizade.

Minha eterna gratidão.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao PROF. DR. JORGE EDUARDO FOUTO MATIAS, pelo apoio incondicional a este projeto, desde seu início. Pela dedicação dispendida no Programa de Pós-graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Paraná. Por acreditar em mim desde o segundo semestre de 1997, por orientar minha vida acadêmica e meus quatro anos de residência em Cirurgia do Aparelho Digestivo, por ser exemplo de ética e serenidade. Pelo relacionamento amigável e respeitoso e, principalmente pela paciência.

Ao PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS LIGOCKI CAMPOS, pela grande dedicação dispendida na coordenação do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

À secretária do Departamento de Pós-graduação em Cirurgia da UFPR, REGINA SASS, pelas orientações e ajuda quanto aos compromissos e normas de funcionamento do Programa.

À patologista DR<sup>a</sup>. DANIELE SAKAMOTO e ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR, pela valiosa contribuição para as análises histológicas.

À estatística SALATE PELANDA, pela valiosa contribuição na análise dos resultados.

Aos amigos e colegas DR. EDIMAR TODERKE e DR. OZIMO GAMA FILHO, pelo auxílio na fase experimental deste estudo.

Ao grande amigo e cirurgião plástico DR. ANDRÉ RICARDO DALL'OGGIO TOLAZZI, pelo auxílio na redação desta tese e apoio na fase final desta pesquisa.

Ao PROF. DR. JÚLIO CEZAR UILI COELHO, pelos primeiros ensinamentos sobre fígado, pelo apoio, perseverança e exemplo profissional.

Ao PROF. DR. JOÃO BATISTA MARCHESINI, pela inestimável contribuição na minha formação médico-cirúrgica, pelas inúmeras oportunidades criadas, pela dedicação docente, pelo exemplo profissional e por nossa afetuosa amizade.

Finalmente, ao meu “bem” maior, MINHA FAMÍLIA, razão principal da minha vida, do meu esforço e do meu futuro. Aos meus amados pais, JUVENTINO E NEDIR, pelos ensinamentos de humildade, de caráter, de ética e de persistência. Pelo sacrifício de superar a distância que nos separa, pelo investimento integral na minha formação pessoal e profissional, por tudo que sou hoje e pelo que ainda serei, por todas as minhas conquistas e pelo gigantesco amor e amizade que nos une. Aos meus irmãos e segundos pais, CARLA E RODRIGO, por sermos um só, por acreditarmos sempre um no outro, por estarmos sempre juntos nas nossas conquistas e pela contribuição inestimável na minha formação e na minha vida. À minha AVÓ VITALINA, pelo exemplo de superação e vitalidade, por estar sempre presente em minha vida. À todos vocês, que fazem minha vida valer a pena, minha eterna gratidão!

“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo”.

*Fernando Pessoa*



## RESUMO

A regeneração hepática ocorre após insultos ao fígado de diversas etiologias como a hepatectomia. Estudos recentes têm sugerido ação estimulatória do imunossupressor ciclosporina no processo de regeneração hepática. Este estudo objetivou avaliar a influência da ciclosporina no processo de regeneração hepática de ratos adultos submetidos à modelo experimental de hepatectomia a 70%. Quarenta ratos machos foram divididos em 4 grupos (C.24h, E.24h, C.7d e E.7d) conforme a medicação fornecida (E - estudo: ciclosporina; C - controle: solução de cloreto de sódio 0,9%) e o dia da morte (24h: 1º dia pós-hepatectomia; 7d: 7º dia pós-hepatectomia). Ciclosporina (10 mg/kg/dia) e solução de cloreto de sódio 0,9% (1ml) foram administrados via gavagem nos ratos dos grupos estudo e controle respectivamente desde o terceiro dia de pré-operatório até a data da morte. Três dias após o início da gavagem, sob anestesia inalatória com isoflurano, realizou-se hepatectomia parcial de 2/3 (70%). No momento da morte dos animais com 24 horas e 7 dias pós-hepatectomia, realizou-se monitorização do peso corporal, aferição da porcentagem de regeneração pela fórmula de KWON, contagem das figuras de mitose existentes em 10 campos de grande aumento aleatórios e percentual dos núcleos positivos em 100 células com marcadores PCNA e Ki-67. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste "*t*" de Student, *Aspin-Welch* e *Mann-Whitney*, adotando nível de significância estatística de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Houve perda ponderal significativa nos grupos e subgrupos comparando-se o peso inicial com o peso no dia da morte dos animais. Com relação aos grupos de 7 dias, foram realizadas aferições de peso corporal chamadas de intermediárias, ou seja, no segundo e quarto dias após a hepatectomia 70%, além de aferição no dia da morte. Ao compararmos os grupos controle com o estudo de 7 dias no segundo, quarto e dia da morte, todos apresentaram diferenças estatisticamente significativas, com perda de peso mais acentuada no grupo em que utilizou-se o imunossupressor. Quanto ao peso hepático, tanto do fígado ressecado quanto do remanescente e peso estimado total, não houve diferença estatisticamente significativa. Com relação ao ganho de volume do fígado (KWON), o grupo C.7d regenerou mais que o C.24h ( $p = 0,0001$ ) e o E.7d da mesma forma quando comparado ao E.24h ( $p = 0,0001$ ). Comparando-se intergrupos, o grupo E.7d foi significativo estatisticamente ( $p = 0,05$ ), sugerindo efeito estimulador da ciclosporina na regeneração hepática ao longo do estudo. A imunoistoquímica com PCNA e Ki-67 foi significativa apenas entre os grupos E.24h e E.7d ( $p = 0,0001$  e  $p = 0,04$  respectivamente). A contagem de figuras de mitose na hematoxilina-eosina evidenciou apenas diferenças estatísticas entre os grupos controle ( $p = 0,006$ ). A ciclosporina, apesar de ser uma droga imunossupressora, influencia positivamente na regeneração hepática ao longo do estudo, porém age negativamente reduzindo peso dos animais até a momento da morte.

Palavras-chave: Regeneração hepática. Ciclosporina. Hepatectomia. Transplante hepático.

## ABSTRACT

Liver regeneration occurs after injuries like hepatectomy. Recent studies have suggested stimulatory effect of cyclosporine in the process of liver regeneration. This study aims to evaluate the influence of the cyclosporine in liver regeneration in rats submitted to an experimental model of 70% hepatectomy. Forty male rats were randomly divided in 4 groups (C.24h, C.7d, E.24h, E.7d), according to the drug used (E: cyclosporine; C: 0.9% sodium chloride solution) and the day of sacrifice (24h: 1<sup>st</sup> day after hepatectomy; 7d: 7<sup>th</sup> day after hepatectomy). Cyclosporine (10 mg/kg/day) and 0.9% sodium chloride solution (1ml) were administered by gavage to the experimental and control group rats since three days before the surgical procedure until their death. Three days after the beginning of gavage, under inhalatory anesthesia with isoflurane, 2/3 partial hepatectomy was performed. During the animals' death in 24 hours and 7 days after the procedure, KWON formula was applied to recognize the gain in liver mass, counting of mitotic figures in 10 HPF and percentage of positive nucleus in 100 cells with PCNA and Ki-67 markers. The results were submitted to statistical analysis using *Student "t"* test, *Aspin-Welch* and *Mann-Whitney* tests, assuming the significance level of 5% ( $p \leq 0,05$ ). There was significant body weight loss in groups and subgroups when compared the initial body weight and the death weight in all animals. Regarding to 7 days subgroups, intermediate body weight on 2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> days after the liver resection, besides death days was done. When compared control groups with 7 day experimental group on 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup> and death days, all of them showed significant statistical differences, with a highest body weight loss on the experimental (cyclosporine) group. Regarding to the hepatic weight, either the resected liver or the remanescant and total liver weight, there was no significant difference. Regarding to the KWON formula, the C.7d regenerated more than the C.24h ( $p = 0,0001$ ) and the same with the E.7d ( $p = 0,0001$ ). Comparing between the groups, only E.7d group was statistically significant ( $p = 0,05$ ), suggesting the stimulating effect of cyclosporine in liver regeneration along the study. PCNA and Ki-67 immunohistochemistry had significant results between the study subgroups E.24h and E.7d ( $p = 0,0001$  and  $p = 0,04$  respectively). The mitotic index revealed only statistical differences in the control subgroups ( $p = 0,006$ ). Cyclosporine, in spite of being an immunosuppressive drug, has a positive effect in liver regeneration, although reduce the animal's body weight until the moment of their death.

Key words: Liver regeneration. Cyclosporine. Hepatectomy. Liver transplantation.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - COMPARAÇÃO ENTRE O PICO DE PROLIFERAÇÃO DOS HEPATÓCITOS E DAS CÉLULAS NÃO PARENQUIMATOSAS....	23
FIGURA 2 - TEMPO PARA A REGENERAÇÃO HEPÁTICA APÓS HEPATECTOMIA 2/3 NO CAMUNDONGO NORMAL.....	24
FIGURA 3 - MODELO MULTIPASSOS DE REGENERAÇÃO HEPÁTICA.....	25
FIGURA 4 - FATORES DE CRESCIMENTO E POSSÍVEIS CONEXÕES COM AS VIAS DAS CITOCINAS .....	26
FIGURA 5 - FATORES DE CRESCIMENTO E POSSÍVEIS CONEXÕES COM AS VIAS DAS CITOCINAS.....	29
FIGURA 6 - VOLUME HEPÁTICO SEGMENTAR ISOLADO NO RATO .....	32
FIGURA 7 - ANATOMIA CIRÚRGICA DO FÍGADO DO RATO COM ELEMENTOS VASCULARES E BILIARES.....	33
FIGURA 8 - DESCRIÇÃO ESQUEMÁTICA DAS HEPATECTOMIAS PARCIAIS NO RATO E VOLUMES DO PARÊNQUIMA APROXIMADOS.....	33
FIGURA 9 - FÓRMULA QUÍMICA ESTRUTURAL DA CICLOSPORINA .....	44
FIGURA 10 - ADMINISTRAÇÃO DA DROGA.....	52
FIGURA 11 - TRICOTOMIA DA REGIÃO VENTRAL COM APARELHO DE TOSA, SOB EFEITO DE ANESTESIA .....	53
FIGURA 12 - PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	53
FIGURA 13 - RESSECÇÃO DO FÍGADO REGENERADO NO 1º OU 7º DIA APÓS HEPATECTOMIA À 70%.....	55
FIGURA 14 - RESSECÇÃO DO FÍGADO REGENERADO NO 1º OU 7º DIA APÓS HEPATECTOMIA À 70%.....	56
FIGURA 15 - (A e B) FOTOMICROGRAFIA REVELANDO FIGURAS DE MITOSE (SETAS) (HE, X400).....	58
FIGURA 16 – (A e B) FOTOMICROGRAFIA REVELANDO POSITIVIDADE NUCLEAR PARA PCNA (SETAS) (IMUNOISTOQUÍMICA, X400)...	59

FIGURA 17 - FOTOMICROGRAFIA REVELANDO POSITIVIDADE NUCLEAR  
PARA Ki-67 (A) E NEGATIVIDADE PARA Ki-67 (B) (SETAS)  
(IMUNOISTOQUÍMICA, X400) ..... 60

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – MÉDIA DOS PESOS INICIAL E NA MORTE EM CADA GRUPO $\pm$ DESVIO PADRÃO. C.24h.....	62
GRÁFICO 2 – EVOLUÇÃO PONDERAL NOS GRUPOS CONTROLE E ESTUDO AO LONGO DA PESQUISA. COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS ( $p$ ).....	64
GRÁFICO 3 – AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON. COMPARAÇÕES.....	65
GRÁFICO 4 – AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA INTRA E INTERGRUPOS ATRAVÉS DO ÍNDICE MITÓTICO.....	66

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA VARIAÇÃO DOS PESOS CORPORAIS INICIAL E NO DIA DA MORTE DENTRO DOS GRUPOS CONTROLE 24 HORAS E 7 DIAS E GRUPOS ESTUDO 24 HORAS E 7 DIAS .....	63
TABELA 2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA INTERGRUPOS (CONTROLE X ESTUDO) DAS MÉDIAS DO PESO CORPORAL INICIAL, NO DIA DA HEPATECTOMIA E NO DIA DA MORTE NOS PERÍODOS 24 HORAS E 7 DIAS .....	63
TABELA 3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DO PESO ESTIMADO DO FÍGADO RESSECADO, PESO ESTIMADO DO FÍGADO RESTANTE E DO PESO TOTAL ESTIMADO DO FÍGADO NO DIA DA HEPATECTOMIA ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ESTUDO NOS PERÍODOS 24 HORAS E 7 DIAS .....	64
TABELA 4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA PORCENTAGEM DO PCNA INTRA E INTERGRUPOS NOS PERÍODOS 24 HORAS E 7 DIAS .....	67
TABELA 5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA PORCENTAGEM DO Ki-67 INTRA E INTERGRUPOS NOS PERÍODOS 24 HORAS E 7 DIAS.....	67

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC –	Lobo Caudado Anterior
aFGF –	Fator de Crescimento de Fibroblastos Ácido
Anvisa –	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C.24h –	Grupo Controle morto em 24 horas pós-hepatectomia
C.7d –	Grupo Controle morto em 7 dias pós-hepatectomia
CEP/SD –	Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde
CNS –	Conselho Nacional de Saúde
COBEA –	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CP –	Processo Caudado
CSA –	Ciclosporina
DP –	desvio padrão
E.24h –	Grupo Estudo morto em 24 horas pós-hepatectomia
E.7d –	Grupo Estudo morto em 7 dias pós-hepatectomia
EGF –	Fator de Crescimento Epidérmico
FDA –	<i>Food and Drug Administration</i>
FL –	Ligamento Falciforme
HB-EGF –	Fator de Crescimento Epidérmico Ligado à Heparina
HE –	Hematoxilina-Eosina
HGF –	Fator de Crescimento dos Hepatócitos
HP –	Hepatectomia Parcial
HSS –	Substância Estimuladora Hepática
IL-1 –	Interleucina 1
IL-2 –	Interleucina 2
IL-5 –	Interleucina 5
IL-6 –	Interleucina 6
Inmetro –	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IRL –	Lobo Lateral Direito Inferior
LF –	Fissura Esquerda
LLL –	Lobo Lateral Esquerdo
LML –	Porção Esquerda do Lobo Mediano
LTβ –	Linfotoxina Beta

M –	Valores Médios
MF –	Ligamento Umbilical
ML –	Lobo Mediano
MMF –	Micofenolato Mofetil
NFKB –	Fator Nuclear da Cadeia Kappa das Células B
<i>p</i> –	nível de significância estatística
p.o. –	pós-operatório
PC –	Lobo Caudado Posterior
PCNA –	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PGE <sub>2</sub> –	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PVPI –	Polivinilpirrolidona-iodo
RF –	Fissura Direita
RML –	Porção Direita do Lobo Mediano
ROS –	Espécies de Oxigênio Reativo
SOCS –	Supressor de Citocinas de Proteínas Sinalizadoras
SRL –	Lobo Lateral Direito Superior
STAT3 –	Sinal de Transdução e Ativador da Transcrição
TCGF –	Fator de Crescimento das Células T
TGF $\alpha$ –	Fator Transformador de Crescimento Alfa
TGF $\beta$ –	Fator Transformador de Crescimento Beta
TH –	Transplante Hepático
TNFR1 –	Receptor tipo 1 para o Fator de Necrose Tumoral
TNF $\alpha$ –	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFPR –	Universidade Federal do Paraná



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1 OBJETIVO GERAL .....	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
2.1 REGENERAÇÃO HEPÁTICA.....	20
2.2 MECANISMOS CELULARES DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA.....	21
2.3 O CICLO CELULAR DOS HEPATÓCITOS.....	22
2.3.1 Via das citocinas e iniciação dos hepatócitos.....	25
2.3.2 Vias dos fatores de crescimento.....	28
2.1.3.3 Interação entre as citocinas e os fatores de crescimento.....	29
2.4 MASSA HEPÁTICA E CAPACIDADE REGENERATIVA.....	30
2.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE REGENERAÇÃO HEPÁTICA.....	31
2.6 MODELOS EXPERIMENTAIS DE HEPATECTOMIA.....	32
2.7 REGENERAÇÃO NA DOENÇA HEPÁTICA.....	34
2.8 FATORES REGULADORES DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA.....	35
2.9 TIPOS DE FATORES DE CRESCIMENTO HEPÁTICO.....	36
2.9.1 Agentes mitogênicos.....	36
2.9.1.1 Fator de crescimento dos hepatócitos (HGF - hepatocyte growth factor). 36	
2.9.1.2 Fator de crescimento epidérmico (EGF – Epidermal Growth Factor).....	37
2.9.1.3 Fator transformador de crescimento alfa (TGF- $\alpha$ – Transforming Growth Factor Alfa) .....	38
2.9.1.4 Fator de crescimento de fibroblastos ácido (aFGF – acidic Fibroblastic Growth Factor).....	39
2.1.9.2 Agentes co-mitogênicos.....	39

2.9.2.1 Substância estimuladora hepática (HSS – Hepatic Stimulatory Substance) .....	39
2.9.2.2 Insulina e glucagon.....	40
2.9.2.3 Norepinefrina.....	40
2.9.2.4 Vasopressina.....	40
2.9.2.5 Esteróides e hormônio tireoideano.....	41
2.9.2.6 Prostaglandinas.....	42
2.9.3 Agentes Inibidores do crescimento.....	42
2.9.3.1 Fator transformador de crescimento beta (TGF $\beta$ –Transforming Growth Factor Beta.....	42
2.9.3.2 Activina.....	43
2.9.3.3 Interleucina 1.....	43
2.10 Imunossupressão e regeneração hepática.....	43
2.10.1 Influência da ciclosporina na regeneração hepática .....	45
<b>3 MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>49</b>
3.1 COMISSÃO DE ÉTICA E PESQUISA.....	49
3.2 ANIMAIS.....	49
3.3 AMBIENTE E ALIMENTAÇÃO.....	49
3.4 GRUPOS.....	50
3.5 PESAGEM DOS ANIMAIS.....	50
3.6 ADMINISTRAÇÃO DE CICLOSPORINA E SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA	50
3.7 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	52
3.8 MORTE.....	54
3.9 ANÁLISE DO PESO CORPORAL.....	56
3.10 ANÁLISE DO PESO DO FÍGADO RESSECADO E REGENERADO.....	56
3.11 CÁLCULO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON.	57

3.12 DETERMINAÇÃO DA REGENERAÇÃO PELO ÍNDICE MITÓTICO (HE)....	57
3.13 COLORAÇÃO PELA IMUNOHISTOQUÍMICA COM PCNA.....	58
3.14 COLORAÇÃO PELA IMUNOISTOQUÍMICA COM KI-67.....	59
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
4.1 PESOS DOS ANIMAIS.....	62
4.2 PESOS DO FÍGADO.....	64
4.3 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON.....	65
4.4 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO ÍNDICE MITÓTICO.....	66
4.5 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO PCNA.....	66
4.6 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO Ki-67.....	67
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>95</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O fígado é um dos mais complexos órgãos do corpo humano, estando envolvido em cerca de 5000 funções, recebendo 2 suprimentos sanguíneos disitintos, sendo composto por 5 tipos celulares diferentes e um complexo arcabouço extracelular. Está sujeito aos mais variados tipos de agressão, tais como metabólicas, tóxicas, microbianas, circulatórias e neoplásicas, possuindo 5 respostas gerais a esses eventos nocivos: degeneração e acúmulo intracelular, necrose e apoptose, inflamação, fibrose e regeneração (TAKAHASHI, 1991).

Uma característica fascinante do fígado é sua notável capacidade de regeneração após injúria. Mesmo após um grande insulto, como uma hepatectomia, o fígado apresenta função suficiente para sustentar a vida.

A regeneração hepática representa um mecanismo de proteção orgânica contra perda de tecido hepático funcionante seja por injúria química, viral, perda traumática ou hepatectomia parcial (HP) (ASSY, 1997; ZAKKO, 1996). Este fenômeno é ainda pouco compreendido e merece esforços de pesquisa para o descobrimento e elucidação de seus complexos mecanismos (RAMALHO, 1993).

Apesar de ser largamente utilizado, o termo “regeneração” é biologicamente incorreto, uma vez que a resposta induzida pelo dano tecidual hepático promove hiperplasia e hipertrofia compensatória do tecido remanescente, até o restabelecimento da massa hepática primitiva. O fígado não regenera no sentido verdadeiro, como nos répteis que são capazes de formar um novo membro ou cauda, porém ocorre uma hiperplasia global tissular residual até que a massa original tenha sido restabelecida. Portanto, as partes ressecadas não são recuperadas (FAUSTO, 1995; LABRECQUE, 1994; MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997; RAMALHO, 1993).

A capacidade regenerativa do fígado é quase ilimitada, como demonstrado em repetidas ressecções hepáticas em ratos. Em circunstâncias normais, o fígado humano inicia a regeneração imediatamente e alcança seu tamanho original em 6 meses (GOVE, 1991), embora alguns estudos tenham mostrado completa regeneração em 3 meses (NAGASUE, 1987). Na maioria dos casos, a função hepática é restabelecida a níveis normais após 2 a 3 semanas da injúria ou em sobreviventes de insuficiência hepática fulminante (NAGASUE, 1987; CANALESE, 1982).

Higgins e Anderson (1931) publicaram um dos primeiros estudos experimentais sobre regeneração hepática em 1931. Este estudo até hoje serve como modelo experimental de hepatectomia para estudo da regeneração hepática em ratos. Removeram cirurgicamente os lobos lateral esquerdo e mediano do fígado de ratos, o que perfaz cerca de 70% da massa hepática total desses animais. Esses autores observaram que a regeneração iniciava no final do primeiro dia e que o índice pré-operatório do peso hepático com o peso corporal foi restaurado do décimo ao décimo quarto dia. A velocidade da regeneração foi maior no terceiro e quarto dia pós-hepatectomia.

Os hepatócitos raramente se dividem em condições normais nos humanos ou animais. No fígado humano de um adulto normal, somente 1 entre 1000 hepatócitos encontra-se em mitose em um dado momento (DIEHL, 1996). Há 3 fases principais durante a multiplicação dos hepatócitos: na fase  $G_0$ , as células estão normalmente em repouso. Após a ressecção hepática, todas as células hepáticas simultaneamente vão quase que imediatamente para a fase  $G_1$  influenciadas principalmente pelo aumento de citocinas como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ). Essas citocinas induzem os hepatócitos a responder aos fatores de crescimento como o fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), o fator de crescimento transformador alfa ( $TGF\alpha$ ) e o fator de crescimento epidérmico ligado à heparina (HB-EGF). Os hepatócitos entram na fase S (síntese de DNA) 12 a 15 horas após a ressecção. Seguem-se a fase  $G_2$  e a mitose (fase M) seguem 6 a 8 horas após a síntese de DNA.

A replicação das demais células do fígado que não os hepatócitos inicia-se geralmente 24 horas após a dos hepatócitos em virtude de uma fase  $G_1$  mais prolongada. Durante essa fase inicial, a maioria dos hepatócitos se divide pelo menos uma vez. Quando o índice massa-volume do fígado primitivo tiver sido alcançado, os hepatócitos retornam a fase  $G_0$ .

No rato o fígado quase dobra seu tamanho nas primeiras 48 horas após a hepatectomia. Uma vez que a massa hepática é restabelecida, a regeneração cessa abruptamente (LABRECQUE, 1994).

Nos últimos anos, têm surgido evidências de aumento da proliferação dos hepatócitos com pré-terapia utilizando drogas imunossupressoras como a ciclosporina (KIM, 1988a, 1990, 1992, 1993; DAOUDAKI, 2003).

O transplante hepático (TH) tornou-se modalidade terapêutica mundialmente aceita e indicada para várias doenças hepáticas em fase terminal de insuficiência orgânica no final da década de 80 após a introdução da ciclosporina como medicamento principal do esquema imunossupressor (SCHREM, 2004; GORDON, 1986; CALNE, 1987).

Experimentalmente, vários pesquisadores relataram que a ciclosporina A poderia influenciar de maneira positiva o processo de regeneração hepática após hepatectomia a 70% em ratos (FRANCAVILLA, 1990a; MAZZAFERRO, 1990; KAHN, 1990; TANAKA, 1993; KIM, 1988a, 1988b, 1990, 1992, 1993; NAGAYOSHI, 2008). Entretanto, vários outros estudos evidenciaram que a restituição do peso hepático não foi influenciada pela ciclosporina no período pós-hepatectomia (KAHN, 1990; PROVENCHER, 1997).

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo foi realizado para avaliar, em dois momentos distintos da regeneração hepática, a influência da ciclosporina sobre o fenômeno da regeneração hepática desencadeada pela hepatectomia parcial de 70% do parênquima hepático em ratos adultos.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A fim de se atingir o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram estipulados:

- Determinar, utilizando o peso corporal, pesos da massa hepática ressecada e do fígado regenerado, a porcentagem de regeneração hepática 24 horas e 7 dias após a hepatectomia 70%;
- Determinar o índice mitótico observado em histologia convencional com hematoxilina e eosina 24 horas e 7 dias após hepatectomia a 70%;
- Determinar por dois métodos imunoistoquímicos de proliferação celular (Ki-67 e PCNA) a proliferação dos hepatócitos nesses dois momentos;
- Correlacionar comparativamente a regeneração hepática determinada por cada método utilizado e avaliar se o imunossupressor ciclosporina altera a regeneração hepática em ratos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 REGENERAÇÃO HEPÁTICA

Regeneração é a habilidade do fígado em restaurar a massa tecidual e a função após injúria ou ressecção parcial, e essa extraordinária habilidade há tempos vem fascinando os médicos e cientistas. O primeiro relato da capacidade de regeneração hepática está descrito na Teogonia de Hesíodo (750 à 700 a.C.). Prometheus, um titã, aborreceu Zeus ao roubar o segredo do fogo e entregá-lo para humanos primitivos. Como punição, Prometheus foi acorrentado à uma rocha nas montanhas Caucasus onde Zeus enviava uma águia diariamente devorava-lhe fígado. Durante cada noite o fígado regenerava, reconstituindo-se por inteiro para novamente ser devorado no dia seguinte, mantendo Prometheus sob castigo indefinidamente (KONIARIS, 2003). Evidências científicas de regeneração hepática em humanos só surgiram em 1890 (PONFICK, 1890).

Apesar de sua grande capacidade metabólica, o fígado é um órgão quiescente em termos de proliferação celular, com apenas 0,0012% a 0,01% dos hepatócitos em fase de mitose (STARZL, 1977; FAUSTO, 1994; DIEHL, 1996; MICHALOPOULOS, 1997). Esse baixo turnover celular em fígados saudáveis pode ser alterado por injúrias tóxicas ou ressecções cirúrgicas, com proliferação massiva de hepatócitos recobrando a massa hepática funcional total ou dois terços dela em 2 semanas. No caso de ressecção hepática, ocorre principalmente a hipertrofia do fígado remanescente do que a restauração dos lobos ressecados. Esse fenômeno é uma hiperplasia compensatória e não regeneração verdadeira (HOLT, 2000).

Sob circunstâncias normais, o fígado humano inicia a regeneração em três dias e alcança seu tamanho original em seis meses (COURT, 2002; LABRECQUE, 1994; NAGASUE, 1987), embora alguns estudos mostrem total restauração em três meses. Na maioria dos casos, a função hepática é restaurada a níveis quase normais em duas a três semanas após a hepatectomia parcial ou em sobreviventes de falência hepática fulminante (NAGASUE, 1987; CANALESE, 1982). No rato e camundongo, o fígado compreende 4,5% do peso corpóreo total, e nos humanos, aproximadamente 2,5% (VAN THIEL, 1987). Os mecanismos de iniciação da regeneração são similares em ratos, camundongos e humanos, porém o tempo do processo é diferente entre essas espécies. Nos roedores, a massa hepática original

é restaurada em aproximadamente 7 a 10 dias (FAUSTO, 2005; BUCHER, 1963). Já em humanos, a completa restauração ocorre em aproximadamente 3 meses (FAUSTO, 2000; MICHALOPOULOS, 1997; FAUSTO, 1994; BUCHER, 1963; MARCOS, 2000).

## 2.2 MECANISMOS CELULARES DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA

O crescimento do fígado adulto depende de um sistema de duas células principais compostas pelos hepatócitos e pelas células precursoras, também chamadas de células ovais (FAUSTO, 2003, 2004, 2005). As células diferenciadas, ou seja, os hepatócitos são a primeira linha de resposta à ressecção ou injúria hepática, enquanto que as células ovais funcionam como compartimento de reserva.

Os hepatócitos, normalmente quiescentes, apresentam alta capacidade regenerativa, sendo capazes de mais de 70 ciclos de replicação (OVERTURF, 1997). Em roedores, a regeneração após ressecção hepática parcial deve-se aos hepatócitos, sem a participação das células progenitoras. No homem, a maioria das pesquisas avalia a regeneração hepática nos transplantes hepáticos parciais ou intervivos através de exames de imagem ao invés de análise histológica. Entretanto, Huang *et al.* (2004) realizaram biópsias em pacientes transplantados e evidenciaram hepatócitos maduros replicados no lobo direito do enxerto logo após o transplante.

Os hepatócitos são também as células responsáveis pela regeneração do fígado após injúria aguda causada por agentes tóxicos como o tetracloreto de carbono. Nos roedores, esse agente causa replicação hepatocitária sem o envolvimento das células ovais (FARBER, 1975). Já a lesão provocada pela galactosamina leva à extensa replicação das células progenitoras, as quais se proliferam e se diferenciam em hepatócitos. Isso ocorre devido à inibição da replicação dos hepatócitos por essa toxina.

Em humanos, um tipo de célula progenitora semelhante às células ovais dos roedores prolifera na falência hepática aguda e nas doenças crônicas do fígado, incluindo o estágio final da cirrose (LIBBRECHT, 2002). Essa célula progenitora tem sido chamada de “célula hepatobiliar intermediária”, e é originada nos canais de Hering. Fujita *et al.* (2000) realizaram biópsias seriadas em transplantados e evidenciaram que as células progenitoras parecem ser as responsáveis pela regeneração dos hepatócitos após insuficiência hepática aguda. Essas células



progenitoras produzem alfa-fetoproteína e quanto maior sua replicação após a injúria hepática, maior a produção dessa substância.

Existe muita controvérsia com relação à produção de hepatócitos em fígados transplantados derivados de células da medula óssea. Sabe-se que esses hepatócitos derivados da medula óssea constituem menos de 1% do total de hepatócitos nos fígados humanos transplantados e raramente são detectados. Fujii *et al.* (2002) não encontraram evidência de que as células da medula óssea gerassem hepatócitos durante a regeneração hepática em ratos submetidos à hepatectomia parcial.

As células não-parenquimatosas também desenvolvem um papel fundamental no processo de regeneração hepática. A exemplo dos hepatócitos, a replicação dessas células é bem sincronizada, sendo que seu pico de proliferação segue o dos hepatócitos em algumas horas. Funcionalmente, as células de Kupffer, células endoteliais e estreladas são essenciais para a proliferação hepatocitária normal. Isso deve-se ao fato de que essas células produzem quase todas as citocinas e fatores de crescimento necessárias ao processo (GRISHAM, 1962).

## 2.3 O CICLO CELULAR DOS HEPATÓCITOS

Os hepatócitos vivem em média 150 dias e raramente se dividem sob condições normais em humanos adultos e animais. No fígado adulto, apenas uma em 1000 células encontra-se em mitose a dado momento e, em ratos, uma célula em 20000 (COURT, 2002; DIEHL, 1996). Após uma hepatectomia parcial de 70% em roedores, aproximadamente 95% dos hepatócitos se dividem em animais jovens e 70% em animais idosos, nos quais a restauração da massa hepática inicial é mais lenta (FAUSTO, 2005).

Essa replicação inicia-se algumas horas após a hepatectomia, ou seja, 12 horas após nos ratos e 32 horas nos camundongos. Os hepatócitos quiescentes estão na fase  $G_0$ . Quase que imediatamente após a hepatectomia, eles entram no ciclo celular (fase  $G_1$ ), 12 a 15 horas após a ressecção progridem para a replicação do DNA (fase S) e então, 6 a 8 horas após, passando pela fase  $G_2$ , entram na fase de mitose (fase M). As diferenças entre o início da replicação e seu pico após a ressecção hepática (24 horas em ratos e 42 horas em camundongos), refletem a variabilidade da duração da fase  $G_1$  entre as espécies (FAUSTO, 2005). A

proliferação das células não parenquimatosas é geralmente retardada por aproximadamente 24 horas como resultado do prolongamento da fase G<sub>1</sub> (LABRECQUE, 1994; KONIARIS, 2003; FABRIKANT, 1968) (Figura 1).

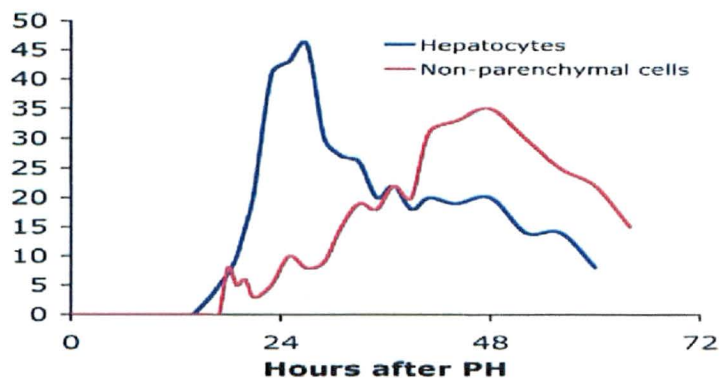


FIGURA 1 - COMPARAÇÃO ENTRE O PICO DE PROLIFERAÇÃO DOS HEPATÓCITOS E DAS CÉLULAS NÃO-PARENQUIMATOSAS  
 FONTE: KONIARIS (2003)

Em animais maiores, após a ressecção parcial do fígado, o pico da síntese de DNA ocorre em 72 a 96 horas em caninos e aproximadamente 7 a 10 dias em primatas (KONIARIS, 2003).

O grau de proliferação dos hepatócitos é diretamente proporcional ao grau de injúria, ou seja, pequenos insultos resultam em reação mitótica local, mas qualquer injúria maior que 10% levam à proliferação de células em todo o fígado (KONIARIS, 2003). Em ressecções maiores que 50%, observam-se um segundo pico de mitoses. Nos ratos e camundongos, esse segundo pico ocorre em 3 a 5 dias. Em pequenos animais, o fígado volta ao tamanho prévio à ressecção em 7 a 10 dias (Figura 2).

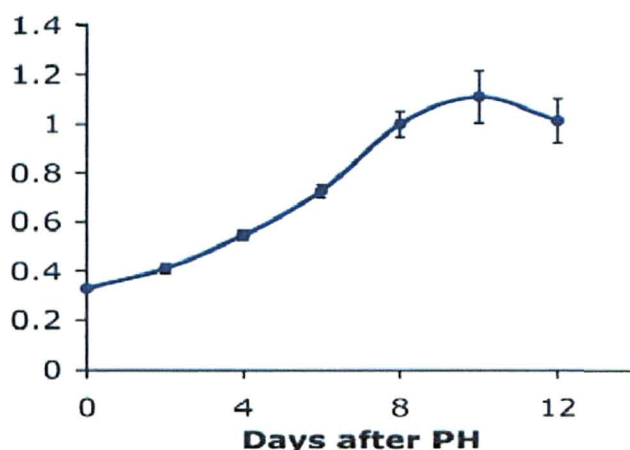


FIGURA 2 – TEMPO PARA A REGENERAÇÃO HEPÁTICA APÓS HEPATECTOMIA 2/3 NO CAMUNDONGO NORMAL  
 FONTE: KONIARIS (2003)

*In vivo*, os primeiros a entrar em mitose são os hepatócitos da zona periportal (zona 1), e nichos de células se replicam em direção as regiões pericentrais, ou seja, em direção da veia centrolobular (zona 3). Essa replicação dos hepatócitos reduz após o quarto dia da hepatectomia parcial e após, as células não-parenquimatosas começam a recriar a arquitetura hepática lobular normal. Durante esse processo, os hepatócitos continuam suas funções metabólicas e de síntese (COURT, 2002; FAUSTO, 1990), a fim de manter a homeostase necessária.

Pelo menos 3 vias foram identificadas na regeneração hepática (FAUSTO, 2005):

- a) Via das Citocinas: responsável pela saída dos hepatócitos da fase de quiescência para a fase de ciclo celular, ou seja, de  $G_0$  para  $G_1$ ;
- b) Via dos Fatores de Crescimento: responsável pela progressão do ciclo celular, ou seja, da fase  $G_1$  para fase S;
- c) Via que conecta os sinais metabólicos com a síntese ribossomal e replicação do DNA.

Cada uma dessas vias é necessária, mas não suficiente, para a regeneração do fígado, sendo que sua interação é essencial para o processo replicativo dos hepatócitos (Figura 3).

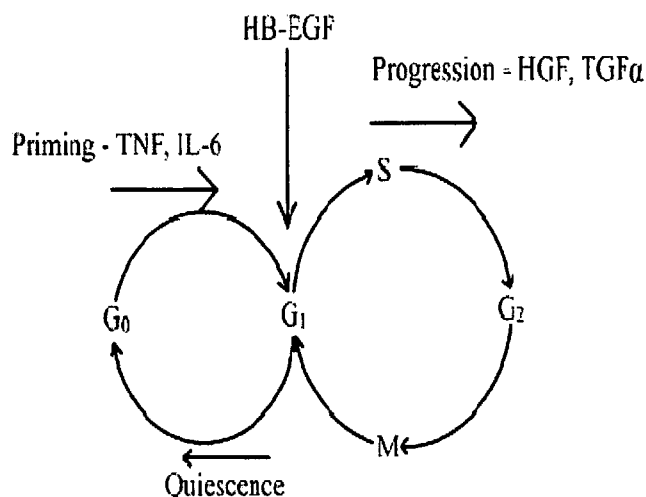


FIGURA 3 – MODELO MULTIPASSOS DE REGENERAÇÃO HEPÁTICA  
 FONTE: FAUSTO E RIEHLE (2005)

Tanto as citocinas quanto os fatores de crescimento ativam um grande número de genes e, a resposta gênica ocorre muito rápida e precoce após a hepatectomia parcial. Essa resposta codifica proteínas com diversas funções (FAUSTO, 2005). Entre esses genes ativados estão os protooncogenes c-fos, c-jun, e c-myc, além dos fatores de transcrição NFκB, STAT3, AP-1 e C/EBPβ. Aproximadamente 185 genes podem estar envolvidos nessa resposta precoce, incluindo fatores de transcrição, genes do ciclo celular, genes envolvidos na transdução de sinais, inflamação, remodelação da matriz extracelular e metabolismo (FAUSTO, 2005).

Após a hepatectomia, as células não parenquimatosas e os hepatócitos remanescentes aumentam a produção de fator de necrose tumoral alfa(TNFα), linfotoxina β (LTβ), interleucina-1 (IL-1) e 6 (IL-6) (TARLÁ, 2006).

### 2.3.1 Via das citocinas e iniciação dos hepatócitos

As citocinas estimulam os hepatócitos a entrar no ciclo celular e responder ao efeito mitogênico dos fatores de crescimento. As principais são o TNFα e a IL-6. Estudos mostram que o receptor tipo I para o TNF (TNFR1) e a IL-6 podem ser essenciais para a completa regeneração hepática (FAUSTO, 2005; YAMADA, 1997).

Tanto o TNF quanto a IL-6 aumentam rapidamente após a ressecção hepática e fazem parte da via TNF→TNFR1→NFκB→IL-6→STAT3, cada um deles aparecendo sequencialmente na regeneração hepática dos roedores nas primeiras

12 horas após a hepatectomia parcial (Figura 4). O TNF- $\alpha$  liga-se ao receptor TNFR1 resultando na translocação do fator nuclear da cadeia Kappa das células B (NFKB).

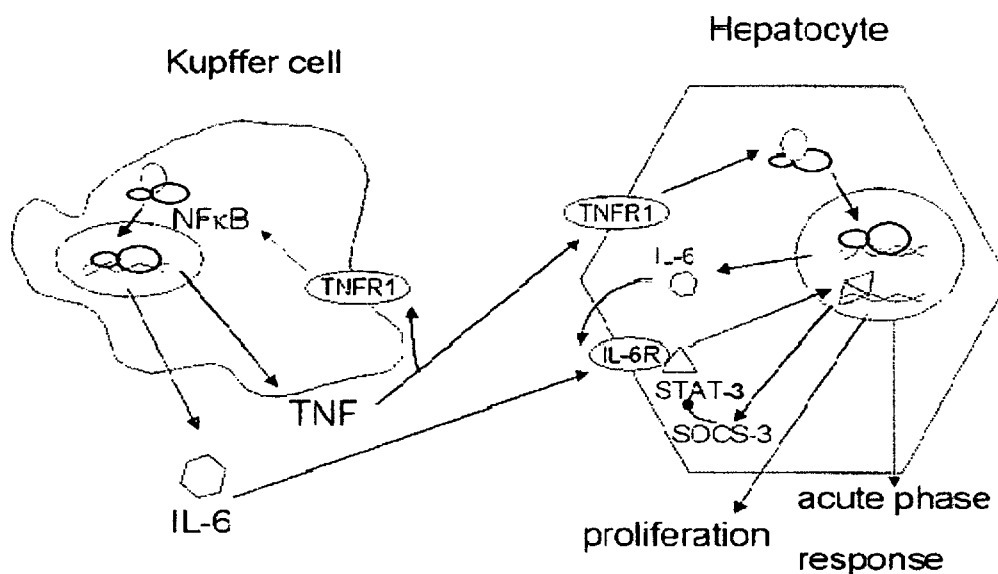


FIGURA 4 – VIA DAS CITOCINAS NA REGENERAÇÃO HEPÁTICA  
FONTE: FAUSTO E RIEHLE (2005)

Originalmente identificado em linfócitos B, o NFKB é encontrado em quase todas as células, incluindo hepatócitos e células não-parenquimatosas (FAUSTO, 2000; FITZGERALD, 1995). Após a hepatectomia, o NFKB é ativado muito rapidamente, dentro de 30 minutos ou menos. Essa ativação é transitória e não dura mais do que 4 a 5 horas (FAUSTO, 2000; FITZGERALD, 1995).

A transcrição desse fator controla a expressão dos genes codificadores de citocinas. O NFKB consiste de diferentes proteínas com atividades biológicas distintas. O TNF também induz a expressão da IL-6, a qual sinaliza a transdução e ativação do STAT3 (TARLÁ, 2006; KOUNTOUAS, 2001). Esse fator de transcrição é conhecido como “sinal de transdução e ativador da transcrição”. O STAT3 é também ativado após a hepatectomia parcial, porém mais lentamente que o NFKB. É detectado no fígado 1 a 2 horas após a ressecção e a ativação dura aproximadamente 4 a 6 horas (FAUSTO, 2000; CRESSMAN, 1995). A sua ligação com a IL-6 leva à dimerização do receptor, ativação de tirosino-quinases intracelulares (JAK), as quais fosforilam gp130 e criam locais para a ligação do

STAT3. É importante na inibição da apoptose dos hepatócitos através da inibição da caspase 3 e da ativação da caspase 8, aumentando a sobrevivência dessas células hepáticas (TARLÁ, 2006; HAGA, 2003). Tanto o NFkB quanto a IL-6 possuem funções protetoras no fígado, e a deficiência de IL-6 e TNFR1 diminuem a regeneração hepática em camundongos (TARLÁ, 2006).

O bloqueio da ativação do NFkB tanto nos hepatócitos quanto nas células não parenquimatosas, inibe a replicação hepatocitária após hepatectomia parcial (FAUSTO, 2005). Entretanto, quando bloqueado, apenas nos hepatócitos não influencia significativamente a regeneração. No fígado em regeneração, a atividade do NFkB tanto como inibidor quanto como estimulador da regeneração hepática é mais importante nas células não parenquimatosas do que nos hepatócitos.

Os genes do ciclo celular ativados após a hepatectomia parcial incluem o p53, mdm2, p21, ciclinas e quinases dependentes das ciclinas. A indução da ciclina D1 é o marcador mais confiável para a progressão do ciclo celular (fase G1) em hepatócitos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (FAUSTO, 2000; ALBRECHT, 1999). A superexpressão dessa ciclina em hepatócitos leva à replicação do DNA até mesmo na ausência dos fatores de crescimento. Hepatócitos primários colocados em meio de cultura sem fatores de crescimento, avançam no ciclo celular mas são bloqueados na fase G1 (FAUSTO, 2000). A adição de fatores de crescimento induz a expressão da ciclina D1, promovendo a replicação do DNA.

O TNF e a IL-6 são importantes mediadores da resposta de fase aguda e aumentam após a hepatectomia. Nessa fase, alguns genes são ativados e não ocorre nenhuma replicação de hepatócitos sem a realização de uma hepatectomia. Os diferentes efeitos do TNF e da IL-6 nessa fase dependem da atividade do supressor de citocinas de proteínas sinalizadoras (SOCS), o qual modula as vias sinalizadoras de citocinas (FAUSTO, 2005; KREBS, 2000; ALEXANDER, 2004).

A IL-6 leva à ativação do STAT3 o qual induz a expressão do SOCS3 no momento em que a atividade desta IL-6 e do STAT3 é máxima na regeneração hepática (FAUSTO, 2005; CAMPBELL, 2001). Em camundongos que não apresentam os componentes do complemento C3a e C5a, ocorre drástica redução na ativação das citocinas e da replicação do DNA após hepatectomia parcial (FAUSTO, 2005).

Embora o TNF possa iniciar a regeneração hepática, ele também pode levar à apoptose dos hepatócitos se administrado em combinação com algumas drogas

como a actinomicina D devido ao bloqueio da transcrição gênica (FAUSTO, 2000). Tanto nos efeitos proliferativos quanto apoptóticos, o TNF gera um excesso de “espécies de oxigênio reativo” (ROS) (FAUSTO, 2000; GROOSSENS, 1995). Nos hepatócitos normais, o ROS é dissipado através da ação da glutatona, porém, isso não ocorre no TNF induzindo apoptose, causando dano estrutural às membranas mitocondriais, diminuindo seu potencial e liberando o citocromo C no citosol. Esse último evento ativa as caspases que levarão à morte celular.

### 2.3.2 Vias dos fatores de crescimento

As citocinas IL-6 e TNF induzem os hepatócitos à responder aos fatores de crescimento. Os 3 fatores mais importantes na regeneração hepática são o fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), fator transformador de crescimento alfa ( $TGF\alpha$ ) e o fator de crescimento epidérmico ligado a heparina (HB-EGF). *In vitro*, os mais potentes estimuladores da replicação dos hepatócitos são o HGF e o  $TGF\alpha$ .

O HGF é produzido pelas células hepáticas não parenquimatosas e age nos hepatócitos por mecanismos endócrinos ou parácrinos. É estocado na matriz extracelular de vários tecidos na sua forma inativa (FAUSTO, 2005; PEDDIADITAKIS, 2001). O HGF sinaliza através do receptor c-met ativando as MAP quinases e por fim a proliferação celular (FAUSTO, 2005; BOROWIAK, 2004).

O  $TGF\alpha$  e o HB-EGF (*heparin binding*) sinalizam através dos receptores do EGF, a qual ativa a cascata da fosforilação levando a replicação do DNA. O  $TGF\alpha$  é produzido pelos hepatócitos e funciona através de mecanismo autócrino. Sua principal função é a de estimular a proliferação dos hepatócitos, mas também age na motilidade celular e na vascularização. A expressão do RNAm do  $TGF\alpha$  é muito baixa em fígados normais, mas aumenta após a hepatectomia e antes do início da replicação do DNA. A expressão do HB-EGF aumenta em grande escala no fígado submetido à hepatectomia parcial (FAUSTO, 2005), precedendo o aumento do HGF e  $TGF\alpha$ .

Acredita-se que o HGF,  $TGF\alpha$  e o HB-EGF apresentam efeitos únicos na replicação hepatocitária e sobrevida, e todos eles são necessários para se avaliar a regeneração hepática em humanos. Os níveis séricos de  $TGF\alpha$  têm sido utilizados para se avaliar a regeneração hepática após a hepatectomia em humanos (FAUSTO, 2005). Os níveis plasmáticos de HB-EGF aumentam 5 a 7 dias após os

pacientes terem se submetido à lobectomia ou segmentectomia e também podem ser utilizados para avaliar a regeneração da massa hepática remanescente (FAUSTO, 2005; YAMADA, 1998).

### 2.1.3.3 Interação entre as citocinas e os fatores de crescimento

As citocinas, os fatores de crescimento e os sinais metabólicos que regulam a expressão gênica devem interagir. *In vivo*, os hepatócitos de um fígado normal são pouco responsivos ao HGF e TGF $\alpha$ . Porém, se for injetado TNF antes da infusão dos fatores de crescimento, esses hepatócitos apresentam uma resposta mitogênica substancial. Isso ocorre porque o TNF sensibiliza os hepatócitos aos efeitos dos fatores de crescimento (FAUSTO, 2005; WEBBER, 1998).

*In vitro*, a exposição dos hepatócitos ao TNF ativa uma metaloproteinase da matriz conhecida como TACE (FAUSTO, 2005; LEE, 2003), a qual leva à clivagem do precursor do TGF $\alpha$  ancorado à membrana celular (FAUSTO, 2005; ARGAST, 2004). O TGF $\alpha$  solúvel liberado, liga-se com o receptor do EGF ativando as MAP quinases e por fim levando à replicação do DNA (Figura 5). Um ponto chave na iniciação da regeneração hepática é a ativação das metaloproteinases da matriz, isso porque essas enzimas podem clivar tanto o TGF $\alpha$  quanto o HB-EGF em fatores de crescimento ativos.

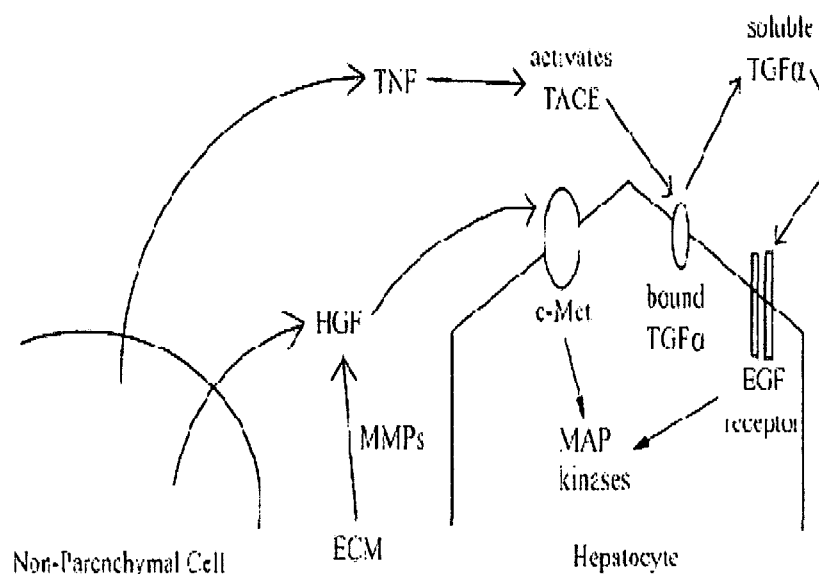


FIGURA 5 – FATORES DE CRESCIMENTO E POSSÍVEIS CONEXÕES COM AS VIAS DAS CITOCINAS  
 FONTE: FAUSTO E RIEHLE (2005)



## 2.4 MASSA HEPÁTICA E CAPACIDADE REGENERATIVA

Em roedores e humanos há uma relação entre o crescimento hepático e a massa corporal. Nos roedores, hepatectomia de 30% não causa uma onda sincronizada de replicação de hepatócitos. Em ressecções envolvendo 40 a 70% do fígado, há uma relação linear entre a extensão da ressecção e a proliferação (FAUSTO, 2005), mas hepatectomias maiores que 70% resultam em maior mortalidade.

Em transplantes hepáticos de roedores e humanos, fígado pequeno implantado em grande receptor cresce até alcançar ótimo índice de massa hepática por massa corporal. Entretanto, grande enxerto em receptor pequeno não cresce. Os implantes hepáticos pequenos para o tamanho do receptor, ou seja, menores que 0,8% a 1% da massa corporal, falham em crescer e levam à morbidade severa e alta mortalidade (FAUSTO, 2005).

Em camundongos submetidos à hepatectomia 30%, a iniciação dos hepatócitos ocorre porém, o ciclo celular não progride (FAUSTO, 2005). Entretanto, a proliferação celular pode ser induzida pela administração de HB-EGF. Outros dados de relevância dos enxertos "*small for size*" reside no fato de que a mortalidade elevada pode ser reduzida pelo bloqueio do RAGE (*receptor for advanced glycation end-products*). Esse bloqueio pode levar ao aumento na produção do TNF e IL-6, aumentando desse modo a replicação do DNA (FAUSTO, 2005; CATALDEGIRMEN, 2005). Com base nesses dados, acredita-se que a combinação do bloqueio do RAGE com a infusão do HB-EGF pode ser eficaz em promover o crescimento nos fígados transplantados considerados "*small for size*".

A regulação da massa hepática não ocorre apenas pela sua expansão. Pelo contrário, quando a massa hepática excede a demanda funcional corporal, o fígado perde parte dessa massa a fim de restaurar a relação massa hepática / massa corporal (FAUSTO, 2000; SCHULTE-HERMANN, 1995). A retirada dos fatores estimuladores de crescimento causa a apoptose dos hepatócitos e a restauração da massa normal. O transplante de um fígado, ou parte, dele maior do que o necessário para o receptor ("*large for size*") leva à uma situação na qual a capacidade funcional do fígado excede a demanda corporal (FAUSTO, 2000; KAM, 1987). Nessas situações, a massa hepática diminui até alcançar o ponto de equilíbrio.

## 2.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE REGENERAÇÃO HEPÁTICA

Experimentalmente, a regeneração hepática tem sido estudada *in vivo* e em culturas de hepatócitos. Existem diferenças significantes nos mecanismos envolvidos nas culturas de hepatócitos *in vitro* comparados com *in vivo* (COURT, 2002; FRANCAVILLA, 1994). Culturas de hepatócitos mostram respostas fisiológicas diferentes daquelas observadas *in vivo* e, tem sido cada vez mais reconhecido que as células não parenquimatosas e as suas interações com os hepatócitos, podem ter um grande e importante papel na regeneração *in vivo* (COURT, 2002; LABRECQUE, 1994).

Outra diferença entre os modelos de regeneração deve-se ao tipo de injúria sofrida pelo fígado, ou seja, através de ressecção cirúrgica ou de agentes tóxicos. Os últimos lesam subpopulações de células hepáticas específicas ou até mesmo todos os tipos celulares, enquanto as hepatectomias deixam poucas células lesadas (KONIARIS, 2003; KAPLOWITZ, 2002).

Por exemplo, a ingestão abusiva de álcool lesa ou mata os hepatócitos nas zonas periportais, já a injúria por isquemia / reperfusão ou por tetracloreto de carbono leva à necrose maciça pericentral. Por outro lado, a D-galactosamina causa lesão pan-hepatocelular e, a exposição ao corante de anilina, lesão seletiva do epitélio dos ductos biliares. A regeneração por sua vez também é específica dependendo do agente nocivo ou do tipo da lesão. No caso da D-galactosamina, os hepatócitos não se proliferam, mas sim as células progenitoras ou células ovais, ao contrário da injúria pelo tetracloreto de carbono (KONIARIS, 2003; KAPLOWITZ, 2002).

A ressecção hepática ou hepatectomia parcial (HP) reduz a massa hepática mas deixa poucas células lesadas. Embora os segmentos hepáticos remanescentes estejam sujeitos ao aumento do fluxo sanguíneo portal e pressão após a HP, este modelo é o que mais se aproxima da “pura” regeneração hepática não acompanhada da injúria celular e é o preferido *in vivo* para o estudo da resposta regenerativa. O rato e o camundongo são os animais de maior utilização devido ao seu pequeno tamanho e baixo custo com sua aquisição e cuidados.

No modelo de hepatectomia dois terços descrito por Higgins e Anderson em 1931, os lobos lateral esquerdo e lobo mediano eram ligados e excisados, resultando na retirada de 65 a 70% do fígado (Figura 6).

Weight distribution in rat liver lobes (RD-758-763, male Lewis, 285-310g, n=6)

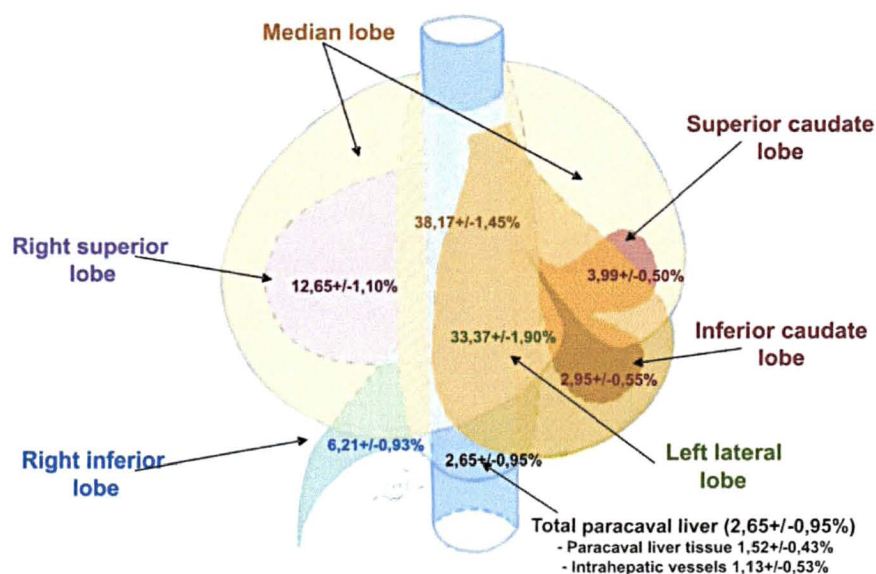


FIGURA 6 – VOLUME HEPÁTICO SEGMENTAR ISOLADO NO RATO  
FONTE: MADRAHIMOV (2006)

## 2.6 MODELOS EXPERIMENTAIS DE HEPATECTOMIA

O modelo clássico de hepatectomia em ratos é baseado nos experimentos de Higgins e Anderson em 1931. Neste procedimento são ressecados os lobos mediano e lateral esquerdo do rato totalizando 70% da massa hepática. Representa um modelo simples de ser realizado devido ao uso de uma única e simples ligadura de pedículo (MARTINS, 2007; HIGGINS; ANDERSON, 1931; RODRIGUEZ, 1999).

Em outros modelos, 90%, 95% e 97% do tecido hepático é ressecado e estes modelos são utilizados para avaliação da regeneração hepática e da falência aguda do órgão (MADRAHIMOV, 2006; GAUB, 1984; EMOND, 1989). Na hepatectomia 90%, além dos lobos mediano e lateral esquerdo, o lobo direito também é extirpado. Na ressecção de 95% da massa hepática, o lobo caudado anterior é retirado juntamente com os lobos supracitados. Na hepatectomia 97%, acrescentam-se o processo caudado à peça cirúrgica, permanecendo apenas as porções paracavais (Figura 7 e 8).

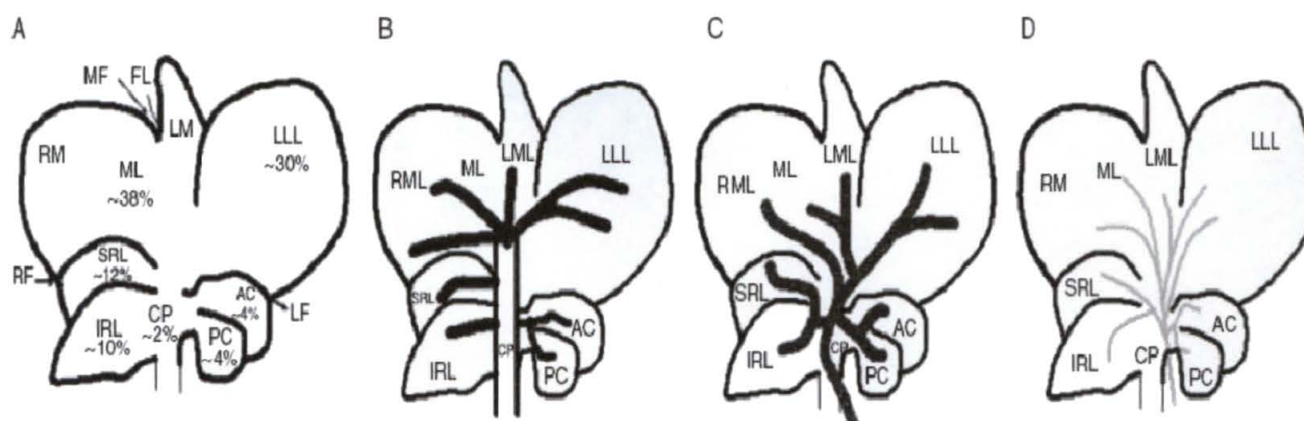


FIGURA 7 – ANATOMIA CIRÚRGICA DO FÍGADO DO RATO COM ELEMENTOS VASCULARES E BILIARES. (A) PORCENTAGEM DE PESO DE CADA LOBO; (B) VEIAS HEPÁTICAS; (C): RAMIFICAÇÃO DA VEIA PORTA; (D) VIA BILIAR. CP, PROCESSO CAUDADO; AC, LOBO CAUDADO ANTERIOR; PC, LOBO CAUDADO POSTERIOR; SRL, LOBO LATERAL DIREITO SUPERIOR; IRL, LOBO LATERAL DIREITO INFERIOR; ML, LOBO MEDIANO; RML, PORÇÃO DIREITA DO LOBO MEDIANO; LML, PORÇÃO ESQUERDA DO LOBO MEDIANO; LLL, LOBO LATERAL ESQUERDO; MF, LIGAMENTO UMBILICAL; LF, FISSURA ESQUERDA; RF, FISSURA DIREITA; FL, LIGAMENTO FALCIFORME  
 FONTE: MARTINS (2007).

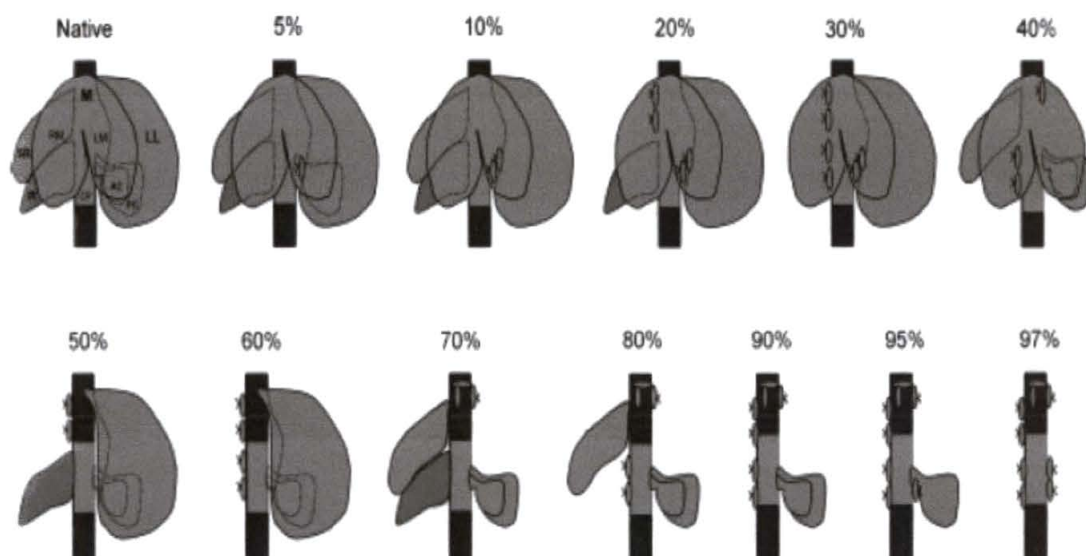


FIGURA 8 – DESCRIÇÃO ESQUEMÁTICA DAS HEPATECTOMIAS PARCIAIS NO RATO E VOLUMES DO PARÊNQUIMA APROXIMADOS. APROXIMADAMENTE, AS PORCENTAGENS DE CADA LOBO HEPÁTICO SÃO SRL 12%, IRL 10%, ML 38% (RML 25% E LML 13%), LLL 30%, AC 4%, PC 4%, CP 2-3%. NA HEPATECTOMIA 70%, OS LLL E ML SÃO REMOVIDOS  
 FONTE: MARTINS (2007)

Em roedores, as ressecções hepáticas são bem toleradas, com mínima mortalidade operatória. Foram descritas quatro técnicas:

- a) Clássica: ligadura em bloco da base do lobo. É a mais utilizada e traz alguns riscos como estenose da veia cava e congestão hepática. Pode ser realizada pela via convencional (HIGGINS E ANDERSON, 1931; RALLI, 1951) ou pela via laparoscópica (KRAHENBUHL, 1998);
- b) Clipes hemostáticos: são usados clipes de titânio ao invés de fios de sutura nos pedículos;
- c) Técnica de preservação do parênquima por orientação dos vasos: descrita por Madrahimov em 2006, não necessita de ligadura prévia do hilo. Realizada através de suturas sequenciais próximas ao clampe de acordo com a anatomia vascular topográfica;
- d) Técnica micro cirúrgica de orientação dos vasos: descrita inicialmente por Kubota (KUBOTA, 1997), é similar à utilizada nas hepatectomias em humanos, apresentando menor risco de sangramento e de constrição da veia cava.

## 2.7 REGENERAÇÃO NA DOENÇA HEPÁTICA

Somente após a remoção do agente causador da injúria hepática que, geralmente, a arquitetura do fígado é restaurada. Caso isso não ocorra, a replicação dos hepatócitos fica prejudicada; fibrose, alterações vasculares, cirrose ou câncer podem aparecer (COURT, 2002; LEEVY, 1998). Ao contrário da hepatectomia parcial, em que parte do fígado não é lesada, as injúrias causadas, por exemplo, pelo tetracloreto de carbono ou hepatite viral afetam todo o parênquima (COURT, 2002; LABRECQUE, 1994).

Sob o ponto de vista clínico, a necrose maciça devido à insuficiência, geralmente necessita de transplante hepático. A lesão crônica e inflamação associada à hepatite B ou C levam à fibrose do fígado. A repetida replicação dos hepatócitos, devido à cirrose ou outra doença crônica, pode causar alteração no DNA e expressão inadequada ou aumentada de oncogenes, levando ao hepatocarcinoma, fato este observado em humanos (COURT, 2002; KITAMURA, 1998; LEEVY, 1998).

A atividade da telomerase é associada à replicação celular. Em um fígado normal, sua atividade é desprezível, porém, ligeiramente aumentada na cirrose e na hepatite e, muito aumentada no carcinoma hepatocelular (COURT, 2002; TAHARA, 1995).

Após ressecção hepática parcial em pacientes cirróticos, as funções se tornam insuficientes para as demandas metabólicas que surgem (COURT, 2002), com regeneração reduzida e vulnerabilidade à falência hepática pós-hepatectomia. A hiperbilirrubinemia tende a ser prolongada. Os cirróticos também apresentam deficiência protéica após a cirurgia (COURT, 2002; NAGASUE, 1987). Ratos com fígado esteatótico também têm sua regeneração hepática reduzida após a hepatectomia e são bem menos tolerantes à isquemia (COURT, 2002; SELZNER, 2000).

## 2.8 FATORES REGULADORES DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA

Devido à dificuldade de estudar a regeneração hepática em humanos, a maioria das informações referentes à proliferação dos hepatócitos deve-se a estudos experimentais em pequenos animais *in vivo* e culturas de hepatócitos *in vitro*. Esses hepatócitos podem ser isolados por perfusão *in situ* e digestão da colagenase seguido da purificação dos outros tipos celulares (KONIARIS, 2003). Na ausência dos fatores de crescimento, os hepatócitos permanecem quiescentes na cultura; porém, quando se administra alguns fatores de crescimento como HGF (fator de crescimento dos hepatócitos), EGF (fator de crescimento epidérmico), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e agentes co-mitogênicos como a insulina, a síntese do DNA ocorre.

A presença de fatores de crescimento hepático no soro de animais hepatectomizados não necessariamente implica que tais fatores sejam responsáveis pelo desencadeamento do processo regenerativo (ALOIA, 2006; BRAUN, 1998; FAUSTO, 1987; LEFFERT, 1988; MEAD, 1989; RAMALHO, 1998).

O mais potente mitógeno hepático *in vitro* é o HGF, mas *in vivo*, esse mitógeno sozinho produz mínima ou nenhuma divisão hepatocelular em animais normais até mesmo quando presente em altas concentrações (KONIARIS, 2003; WEBBER, 1998). Já *in vivo*, vários estudos mostram a interleucina-6 (IL-6) como um potente mitógeno (KONIARIS, 2003; ZIMMERS, 2003).

## 2.9 TIPOS DE FATORES DE CRESCIMENTO HEPÁTICO

Alguns fatores de crescimento já são bem conhecidos e podem ser divididos em 3 categorias principais (RAMALHO, 1993; RAMALHO, 1998):

- Agentes mitogênicos ou indutores do crescimento;
- Agentes co-mitogênicos;
- Agentes inibidores do crescimento.

### 2.9.1 Agentes mitogênicos

São definidos como substâncias capazes de estimular os hepatócitos em culturas na fase G<sub>0</sub> e induzir a síntese de DNA e mitose. Os exemplos incluem o EGF, TGF e o mais potente de todos, o HGF. Todos esses fatores estão aumentados após uma hepatectomia 70% e a infusão do soro desses ratos hepatectomizados em ratos normais pode também induzir a síntese de DNA. Todos esses mitógenos isoladamente podem induzir a síntese de DNA em culturas de hepatócitos e, este efeito pode ser potencializado por mitógenos incompletos ou co-mitógenos como a insulina, glucagon, adrenalina e noradrenalina (COURT, 2002; BUCHER, 1991; MICHALOPOULOS, 1990).

Na ausência de injúria hepática, quando os hepatócitos são expostos aos mitógenos, ocorre apenas um pequeno aumento na expressão dos genes imediatos. Entretanto, mitógenos podem induzir hiperplasia hepática que regride após sua retirada, sugerindo que sem lesão hepática a replicação pode ocorrer por uma via diferente (COURT, 2002; COLUMBANO, 1996).

#### 2.9.1.1 Fator de crescimento dos hepatócitos (HGF - hepatocyte growth factor)

O HGF é o mais importante e potente mitógeno de todos. Seus níveis aumentam bastante tanto no sangue quanto no fígado nos casos de injúria hepática extensa. É sintetizado e secretado por inúmeros tecidos e também pelas células hepáticas não-parenquimatosas, principalmente as de *Kupffer*, não sendo encontrado em hepatócitos de fígados normais ou em regeneração. Sua ação é potencializada na presença de insulina, glucagon e EGF (COURT, 2002; GOVE, 1991; BUCHER, 1991). Seu efeito é inibido pela somatostatina, parcialmente inibido



pela heparina e potencializado pela norepinefrina. Sua secreção é reduzida pelos glicocorticóides e TGF. (ALOIA, 2006; MICHALOPOULOS, 1984; ZARNEGAR, MICHALOPOULOS, 1989; RAMALHO, 1998; MICHALOPOULOS, ZANERGAR, 1992).

Particularmente, níveis elevados de HGF são encontrados em pacientes com insuficiência hepática fulminante, com valores ainda mais altos naqueles que evoluem a óbito. Também em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise, e sem lesão hepática, os níveis de HGF são elevados (COURT, 2002). Sua presença em tecidos envolvidos na circulação portal sugere que o efeito trófico hepático pode ser oriundo de outros sítios. Apesar destes níveis plasmáticos elevados de HGF e a presença de receptores em vários outros órgãos, a regeneração não é desencadeada em outros tecidos e a razão disso ainda permanece desconhecida (COURT, 2002; LABRECQUE, 1994).

Cerca de uma hora após a ressecção hepática em ratos e humanos, os níveis plasmáticos de HGF elevam mais de 20 vezes, fazendo dele o principal desencadeador do processo regenerativo após a hepatectomia parcial. O mecanismo para a indução extra-hepática do RNAm do HGF depois da hepatectomia é desconhecido. O efeito mitogênico do HGF sobre os hepatócitos ocorre pela via parácrina e endócrina (ALOIA, 2006; ANKOMA-SEY, 1999; RAMALHO, 1998; MICHALOPOULOS, ZANERGAR, 1992).

#### 2.9.1.2 Fator de crescimento epidérmico (EGF – Epidermal Growth Factor)

É uma glicoproteína que estimula o crescimento de vários tecidos epidérmicos e epiteliais tanto *in vivo* quanto *in vitro* e, o crescimento de alguns fibroblastos em culturas celulares (KONIARIS, 2003; SCHLESSINGER, 2000). É o hormônio mais frequentemente utilizado para induzir a síntese de DNA em culturas de hepatócitos, sendo seu efeito usado como modelo, contra o qual é comparada a atividade de outros fatores de crescimento hepático. O EGF tem seu efeito potencializado pela insulina e glucagon tanto *in vivo* quanto *in vitro* (ALOIA, 2006; MCGOWAN, 1981; GUPTA, 1992).

Em ratos e camundongos o sítio de maior produção do EGF são as glândulas salivares. O EGF é também secretado pelas glândulas de Brunner do duodeno, rins e pâncreas. A sialoadenectomia resulta em diminuição do EGF circulante e um



atraso na síntese do DNA após hepatectomia parcial em camundongos e bloqueio completo da regeneração hepática em ratos (KONIARIS, 2003; NOGUCHI, 1991). A administração de EGF corrige esses defeitos. Outros estudos evidenciam que a ressecção das glândulas de Brunner reduzem o processo regenerativo ao contrário da sialoadenectomia (ALOIA, 2006; OLSEN, 1988; RAMALHO, 1998).

Quando o EGF é adicionado às culturas de hepatócitos, a síntese de DNA tem seu pico entre 48 e 72 horas e não antes de 24 horas como ocorre *in vivo*. Porém se o EGF for infundido 24 horas após o isolamento dos hepatócitos, a resposta é muito mais rápida. Isso reflete o tempo de adaptação dos hepatócitos ao ambiente *in vitro*. Esse fator de crescimento leva à 2-3 ciclos de síntese de DNA e, por razões ainda desconhecidas, há interrupção após esses ciclos. O TGF inibe a atividade do EGF (ALOIA, 2006; MCGOWAN, 1981; HOUCK, MICHALOPOULOS, 1989; RAMALHO, 1998).

#### 2.9.1.3 Fator transformador de crescimento alfa (TGF- $\alpha$ – Transforming Growth Factor Alfa)

O TGF- $\alpha$  é um membro da família do EGF que compartilha e atua sobre o mesmo receptor e aparentemente não é essencial para a regeneração hepática. Por essa razão, o TGF- $\alpha$  é também mitogênico para os hepatócitos *in vitro*. O TGF- $\alpha$  é também sintetizado por tecidos normais *in vivo* e por células em cultura (ALOIA, 2006; FAUSTO, 1989; RAMALHO, 1998; BRENNER, 1989).

Esse fator de crescimento é sintetizado por hepatócitos em regeneração, mas não por células não parenquimatosas. Isso foi comprovado por Webber *et al.* (KONIARIS, 2003; WEBBER, 1998) com a injeção de 80  $\mu$ g de EGF ou TGF- $\alpha$  em fígado de ratos. A síntese de DNA ocorreu em menos de 2% dos hepatócitos. Após uma hepatectomia parcial, ocorre elevação nos níveis do RNAm para TGF- $\alpha$  em 4 a 5 horas com um pico cerca de 10 vezes maior em 24 horas após a ressecção hepática. O TGF- $\alpha$  tem um pico 24 horas e outro 72 horas após essa ressecção. *In vitro*, também é observado elevação nos níveis de RNAm e da secreção de TGF- $\alpha$  durante a replicação (ALOIA, 2006; MEAD; FAUSTO, 1989; RAMALHO, 1998).

A produção de TGF- $\alpha$  por hepatócitos em regeneração não é responsável pela iniciação do processo regenerativo. O TGF- $\alpha$  agiria sobre um hepatócito já iniciado (fase G1) sendo fundamental para a síntese de DNA. Esse TGF- $\alpha$  também

estimula a proliferação de células não parenquimatosas adjacentes (ALOIA, 2006; MICHALOPOULOS, 1990; RAMALHO, 1998).

#### 2.9.1.4 Fator de crescimento de fibroblastos ácido (aFGF – acidic Fibroblastic Growth Factor)

Também conhecido como fator de crescimento ligante à heparina 1 (*Heparin Binding Growth Factor 1*). É secretado pelos hepatócitos em regeneração com pico de secreção coincidindo com o pico de síntese de DNA. Apenas 50% dos hepatócitos responde ao aFGF. Este fator de crescimento reduz o efeito inibitório do TGF- $\alpha$  sobre a replicação induzida pelo EGF. Sua atividade mitogênica é menor que a deste último e a heparina potencializa sua ação (ALOIA, 2006; GUPTA, 1992; KAM, 1989; RAMALHO, 1998).

#### 2.1.9.2 Agentes co-mitogênicos

São agentes que não têm efeito direto na proliferação dos hepatócitos, mas são capazes de potencializar o efeito dos agentes mitogênicos e reduzir o efeito dos agentes inibidores. Não possuem efeitos mitogênicos quando adicionados isoladamente em meios de cultura (COURT, 2002; BUCHER, 1991; ALOIA, 2006; RAMALHO, 1993; RAMALHO, 1998).

#### 2.9.2.1 Substância estimuladora hepática (HSS – Hepatic Stimulatory Substance)

É uma substância capaz de estimular a síntese de DNA nas células já induzidas previamente. Porém, o HSS é um potente mitógeno para os hepatócitos malignos (COURT, 2002; LABRECQUE, 1984). Uma peculiaridade é sua aparente especificidade hepática, tanto *in vivo* como *in vitro*, e é secretado pelo próprio fígado (COURT, 2002; LABRECQUE, 1982; LABRECQUE, BACHUR, 1982).

Nos estudos *in vitro*, foi demonstrada a necessidade da adição de EGF para o desencadeamento da resposta proliferativa. Evidencia-se um grande aumento da síntese de DNA nos hepatócitos se comparado ao efeito isolado do EGF (ALOIA, 2006; FLEIG; HOSS, 1989; RAMALHO, 1998). Já *in vivo*, 12 horas após a hepatectomia parcial torna-se detectável sua capacidade de estimular a síntese de

DNA, com um pico 26 horas após a ressecção, persistindo por cerca de 72 horas. Torna-se indetectável após 8 dias (ALOIA, 2006; LABRECQUE, 1991; LABRECQUE, 1975; RAMALHO, 1998).

#### 2.9.2.2 Insulina e glucagon

São dois hormônios importantes para o trofismo e metabolismo dos hepatócitos. Essas duas substâncias atuam sinergicamente na regeneração hepática. *In vitro*, a ausência da insulina pode causar a degeneração e morte dos hepatócitos. Porém, a adição de insulina pode reverter ou prevenir a atrofia hepática que ocorre na deficiência desse hormônio (ALOIA, 2006; ANKOMA-SEY, 1999).

A síntese de DNA é pequena com o EGF sozinho, porém torna-se maior com a adição de glucagon e insulina. Esses dois últimos hormônios falham na iniciação da proliferação dos hepatócitos em animais com fígado sadio, o que sugere a necessidade de adicionar fatores (KONIARIS, 2003; STARZL, 1978).

Estudos sugerem que fatores humorais no sangue portal, possivelmente a insulina e o glucagon, podem ser importantes na regulação da regeneração hepática, mas tem pouco efeito sozinhos, sendo necessária a associação com o EGF (ALOIA, 2006; BAKER, 1985; MCGOWAN, 1981). Após a hepatectomia parcial, a síntese de DNA pode ser inibida pela administração de anticorpos anti-insulina. A concentração de insulina na veia porta diminui rapidamente após a hepatectomia parcial, enquanto os níveis de glucagon aumentam (ALOIA, 2006; RAMALHO, 1998; STARZL, 1978).

#### 2.9.2.3 Norepinefrina

Essencial durante as fases iniciais da regeneração hepática. *In vitro*, possui propriedades mediadas pelo receptor alfa-1 adrenérgico, ou seja, não é mitogênica sozinha, exacerba o potencial mitogênico do EGF e é capaz de reduzir o efeito inibitório do TGF (ALOIA, 2006; CRUISE, MICHALOPOULOS, 1986; RAMALHO, 1998).

#### 2.9.2.4 Vasopressina

Em ratos com deficiência congênita de vasopressina, a regeneração hepática encontra-se reduzida e é restabelecida após administração desse hormônio (ALOIA, 2006; RUSSELL, 1983; RAMALHO, 1998). A vasopressina é secretada nas sinapses simpáticas hepáticas juntamente com a norepinefrina, podendo ambas estarem envolvidas nos efeitos do sistema simpático sobre a regeneração (ALOIA, 2006; MICHALOPOULOS, 1990; RAMALHO, 1998).

#### 2.9.2.5 Esteróides e hormônio tireoideano

Os esteróides são bem conhecidos por modular uma variedade de processos celulares em vários tipos de células. Estes efeitos são também significantes nos hepatócitos, onde os esteróides regulam tanto o crescimento transitório celular como o metabolismo de ácidos graxos destas células (KONIAIRS, 2003; REPA, 2000; KUEBLER, 2001, 2002).

Após uma hepatectomia parcial, os níveis séricos de estrógenos encontram-se elevados, com um pico 24 a 48 horas após o procedimento. Ao contrário, os níveis de testosterona estão reduzidos após a hepatectomia parcial, assim como os receptores nucleares para andrógenos (KONIAIRIS, 2003; FRANCAVILLA, 1989a, 1989b). O pré-tratamento com 17  $\beta$ -estradiol induz a síntese de DNA nos hepatócitos de rato em cultura e acelera a regeneração hepática *in vivo* nesses animais. O tamoxifeno reduz a proliferação dos hepatócitos se administrado logo após a hepatectomia parcial (KONIAIRIS, 2003; FRANCAVILLA, 1989b).

Em homens, os níveis séricos de estradiol se elevam rapidamente, com um pico 48 horas após a ressecção hepática, enquanto os níveis de testosterona diminuem. No entanto nas mulheres, não se observa nenhuma alteração significativa nos níveis de estradiol e testosterona após a hepatectomia (ALOIA, 2006; FRANCAVILLA, 1990a; RAMALHO, 1998; SVANAS, 1989).

O hormônio tireoideano T3 é também um potente indutor da proliferação dos hepatócitos *in vitro* e *in vivo* (KONIAIRIS, 2003; FRANCAVILLA, 1994), embora a regeneração hepática seja quase normal em ratos com hipotireoidismo ou tireoidectomizados (KONIAIRIS, 2003; BEYER, 1992).

Glicocorticóides inibem a proliferação dos hepatócitos e reduzem a expressão de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos (KONIAIRIS, 2003; IBDAH,

2000). O uso desses hormônios pode prejudicar a regeneração hepática tanto por agravar a esteatose quanto por inibir o crescimento do próprio fígado.

#### 2.9.2.6 Prostaglandinas

Estudos da década de 70 sugeriram que as prostaglandinas, incluindo a  $E_2$  ( $PGE_2$ ), prostaciclina e tromboxano podem estar envolvidos na regulação do crescimento hepático após hepatectomia (KONIARIS, 2003; MACMANUS, 1976). As prostaglandinas são formadas a partir da degradação do ácido araquidônico dos fosfolípidos das membranas pela fosfolipase  $A_2$ .

A adição de ácido araquidônico ou de prostaglandinas à cultura de hepatócitos provoca aumento na síntese de DNA. Em animais cirróticos, a infusão de prostaglandina  $E_2$  aumenta a síntese hepática de DNA 24 horas após a hepatectomia. As células de Kupffer de fígados em regeneração apresentam grande capacidade de secreção dessas prostaglandinas. Isso ocorre precocemente e persiste por até 48 horas após a ressecção hepática (ALOIA, 2006; ADDREIS, 1981; RAMALHO, 1998).

Drogas bloqueadoras das prostaglandinas como a indometacina inibem a síntese de DNA. Entretanto, o mecanismo pelo qual a regeneração hepática sofre influência das prostaglandinas ainda não está totalmente elucidado (ALOIA, 2006; KWON, 1990; RAMALHO, 1998).

#### 2.9.3 Agentes Inibidores do crescimento

Essas substâncias apresentam capacidades em inibir a mitogênese induzida pelo EGF.

##### 2.9.3.1 Fator transformador de crescimento beta ( $TGF\beta$ – Transforming Growth Factor Beta)

É uma citocina multifuncional que possui tanto efeitos inibidores quanto estimuladores dependendo do tipo celular e das condições envolvidas. Se administrado concomitantemente, inibe os efeitos do  $TGF\alpha$ ; porém não apresenta efeito quando administrado com outros agentes mitogênicos, como HGF, ou co-

mitogênicos como a insulina (COURT, 2002). É produzido tanto pelos hepatócitos quanto pelas células não parenquimatosas. Os hepatócitos normais não podem ativar o TGF $\beta$ , mas aqueles em regeneração podem (COURT, 2002; DIEHL, 1996).

Em cultura de hepatócitos, inibe a mitogênese induzida pelo EGF, pelo TGF $\alpha$  e pelo HGF. Em ratos, sua administração antes e após uma hepatectomia parcial inibe o pico de síntese de DNA que ocorre 24 horas após a cirurgia. O mecanismo responsável por esse efeito inibitório ainda é desconhecido (ALOIA, 2006; FAUSTO, 1991; RAMALHO, 1998; RUSSELL, 1988).

#### 2.9.3.2 Activina

É um membro da superfamília TGF $\beta$ , sendo um potente inibidor da proliferação dos hepatócitos *in vitro* e *in vivo* (KONIARIS, 2003; YASUDA, 1993; SCHWALL, 1993). A folistatina tem alta afinidade pela activina inibindo sua ligação com os receptores e sua atividade biológica (KONIARIS, 2003; HILLIER, 1993). Por esse motivo, a injeção de folistatina estimula transitoriamente a proliferação hepatocelular (KONIARIS, 2003; KOGURE, 1996).

#### 2.9.3.3 Interleucina 1

Tem a capacidade de inibir a proliferação dos hepatócitos. A inibição não é completa, como com o TGF $\beta$ , e cerca de 20% dos hepatócitos permanecem em síntese (ALOIA, 2006; NAKAMURA, 1988; RAMALHO, 1998).

### 2.10 Imunossupressão e regeneração hepática

A imunossupressão nos transplantes visa induzir tolerância ao enxerto, mantendo a capacidade do sistema imune de neutralizar microorganismos patogênicos. Durante a década de 80, a introdução da ciclosporina, um inibidor da calcineurina, a imunossupressão atingiu nível de eficiência para que vários centros no mundo iniciassem atividade clínica regular em transplantes de vários órgãos sólidos que até então eram realizados apenas em nível experimental, inclusive o transplante hepático (SCHREM, 2004; GORDON, 1986; CALNE, 1987). Atualmente,

os inibidores da calcineurina, ciclosporina e tacrolimus, são a base da maioria dos esquemas de imunossupressão utilizados no transplante de órgãos.

A ciclosporina (*Neoral*<sup>®</sup>, *Sandimmun*<sup>®</sup>), também conhecida como ciclosporina A, é um polipeptídeo cíclico lipofílico neutro constituído por 11 aminoácidos e foi introduzida como droga imunossupressora por *Roy Calne* em 1979 (CALNE, 1979). Sua aplicação no transplante hepático praticamente dobrou a sobrevida de um ano dos pacientes de 30 a 35% com esquemas utilizando azatioprina e esteróides para 70% com ciclosporina associada a esteróides.

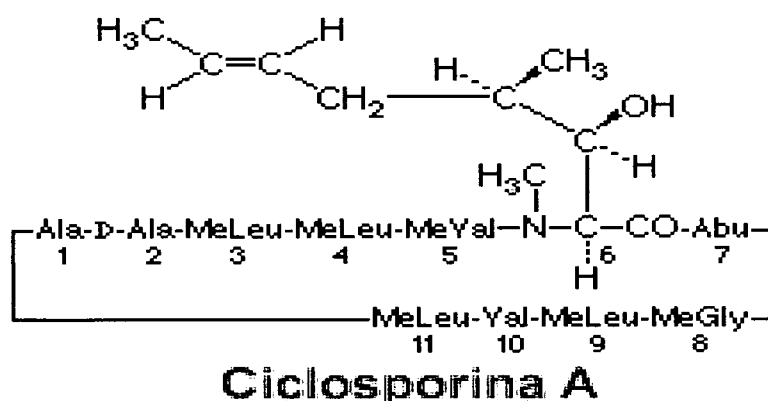


FIGURA 9 – FÓRMULA QUÍMICA ESTRUTURAL DA CICLOSPORINA  
FONTE: WWW.NETDRUGS.INFO

Produzida através de um fungo (*Tolypocladium inflatum*), possui a fórmula molecular  $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$  e peso molecular de 1202,6.

É um pó cristalino, fino, branco, com odor característico, solúvel em metanol, etanol, acetona, éter e clorofórmio, levemente solúvel em água e hidrocarboneto saturado. A ciclosporina de microemulsão (*Neoral*<sup>®</sup>) foi aprovada em 1995 nos Estados Unidos como primeira escolha em transplantados renais, hepáticos e cardíacos alogênico (SCHREM, 2004; HENRY, 1999). A fórmula inicial oleosa (*Sandimmun*<sup>®</sup>) era caracterizada por alta variabilidade farmacocinética e baixa biodisponibilidade. A fórmula de microemulsão foi então desenvolvida para evitar esses problemas, mantendo os níveis sanguíneos mais estáveis (SCHREM, 2004; DUNN, 2001). O tacrolimus (FK506), um macrolídeo com mecanismo de ação similar à ciclosporina (SCHREM, 2004; THOMSON, 1995) foi aprovado para uso em transplantados hepáticos em 1994 (SCHREM, 2004; HENRY, 1999).

Vários trabalhos têm evidenciado que agentes imunossupressores como a ciclosporina e o tacrolimus (FK 506) são capazes de estimular a proliferação

hepatocelular em ratos submetidos à hepatectomia parcial (KIM, 1988a, 1988b, 1990, 1992, 1993; NAGAYOSHI, 2008). Porém, *in vitro*, a adição desses imunossuppressores não resultou em qualquer efeito sobre a replicação celular (FRANCAVILLA, 1991a; FRANCAVILLA, 1991b; RAMALHO, 1998).

A CsA interage com uma proteína do citoplasma, a ciclofilina (CpN – receptor intracelular da CsA), formando um complexo que inibe a fosfatase  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina-dependente (Calcineurin). A defosforilação do NF-AT é mediada pela calcineurina e é essencial para a translocação deste fator de transcrição para o núcleo da célula.

Uma vez bloqueada a atividade fosfatase da calcineurina, a translocação do NF-AT não ocorre, impedindo desta forma a transcrição de citocinas e vários outros genes. A CsA também inibe a atividade do NF- $\kappa$ B, não atuando entretanto, na AP-1. Esta interação determina a inibição da expressão gênica de diversas citocinas, como a IL-2 e em especial a IL-5. A IL-2 era anteriormente conhecida como TCGF (*T Cell Growth Factor*) e tem como principal ação a de assegurar a expansão clonal dos linfócitos T ativados.

A CsA apresenta outras ações em várias células: determina a redução da liberação de histamina pelos basófilos, reduz a síntese de IL-1, do fator de necrose tumoral (TNF), do superóxido, do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos, assim como reduz a quimiotaxia de neutrófilos e as concentrações do receptor solúvel IL-2. Em modelos animais, a CsA inibe a resposta tardia da asma, a afluência de eosinófilos e a subsequente hiper-responsividade após provocação antigênica *in vivo*.

A ciclosporina não é mielotóxica. A dose habitualmente utilizada é de 5 mg/kg/dia. Sua utilização é restrita, entretanto, devido aos efeitos colaterais como a propensão à infecções, hipertensão arterial, hipertricose, hiperplasia gengival, sendo tóxica ao fígado, rins e sistema nervoso. Uma forma inalável talvez possa reduzir tais efeitos (SCHREM, 2004; JORGENSEN, 2003; STARZL, 1982).

#### 2.10.1 Influência da ciclosporina na regeneração hepática

Pouco se conhece à respeito do transplante, rejeição e imunossupressão na regeneração após a ressecção subtotal do fígado. A maioria dos estudos utiliza o modelo de hepatectomia a 70% em ratos para avaliação da regeneração hepática.



Poucos estudos tratam do efeito da ressecção subtotal na regeneração hepática influenciado pela imunossupressão (DAHMEN, 2002).

Desde seu desenvolvimento inicial como agente imunossupressor no transplante, muitos estudos têm examinado seus efeitos hepatotóxicos, mas também seu papel como indutor da regeneração hepática. Foi demonstrado aumento da proliferação de hepatócitos em fígados não hepatectomizados, embora alguns autores acreditem que a ciclosporina tenha um efeito inibitório sobre a regeneração hepática, possivelmente relacionado ao importante papel desenvolvido pelos linfócitos T na regeneração após hepatectomia parcial. Além disso, alguns estudos em ratos transplantados evidenciam que os efeitos hepatotóxicos ou hepatotróficos da ciclosporina são dose-dependentes (ALVIRA, 2002).

Alvira *et al.* (2002) estudaram o efeito da ciclosporina na regeneração do enxerto e na função após o transplante hepático em porcos. Esses autores não evidenciaram nenhuma diferença estatística tanto no aumento de volume do enxerto quanto na regeneração hepática nos grupos com e sem ciclosporina.

Existem evidências de que os inibidores de calcineurina aumentam a regeneração hepática após ressecções hepáticas e transplantes hepáticos com enxertos do tipo *split liver* (DAHMEN, 2002). Francavilla *et al.* também demonstraram o efeito hepatotrófico desses imunossupressores na regeneração hepática no modelo de hepatectomia conforme descrito por Higgins e Anderson (DAHMEN, 2002; FRANCAVILLA, 1991a).

O estímulo à divisão dos hepatócitos pode comprometer a capacidade de um número limitado dessas células em desempenhar completamente suas funções metabólicas, possivelmente levando o animal à morte. Alternativamente, pode aumentar a sobrevida devido ao maior número de hepatócitos ativos metabolicamente em curto período de tempo. Similarmente, a inibição da regeneração hepática pode aumentar a performance metabólica dos hepatócitos remanescentes e melhorar a sobrevida do animal ou, por outro lado, se o número de células ativas permanecer muito baixo, levar à morte (DAHMEN, 2002).

Dahmen *et al.* (2002) compararam os efeitos de 4 drogas imunossupressoras na regeneração hepática após hepatectomia parcial. O efeito hepatotrófico dos inibidores da calcineurina foi comprovado no estudo, assim como aumento na sobrevida dos animais. Em contraste, as drogas antiproliferativas inibiram, como esperado, a regeneração hepática. O sirolimus não alterou a sobrevida e o

micofenolato mofetil a reduziu significativamente quando comparado ao grupo controle. Baseado nesses resultados, receptores de enxerto parcial deveriam receber inibidores de calcineurina e evitar drogas antiproliferativas como o micofenolato mofetil.

Shinohara *et al.* (2007) compararam a administração de ciclosporina e placebo em ratos submetidos à hepatectomia 70 e 90%. Com relação à regeneração hepática, não houve diferença estatística entre os grupos. Coughlin *et al.* (1987) estudaram a regeneração hepática em ratos submetidos à hepatectomia parcial e então tratados diariamente com ciclosporina, dexametasona e a combinação de ambos. Todos os animais apresentaram perda de peso, fenômeno esse comum a essas drogas. Os ratos tratados com ciclosporina aumentaram em 4 vezes a síntese de DNA nos 6 primeiros dias após a ressecção hepática.

Kim *et al.* (1990) realizaram a pré-terapia com ciclosporina na dose de 10mg/Kg/dia em ratos submetidos à ressecção de 90% da massa hepática. Os resultados evidenciaram aumento na proliferação dos hepatócitos quando comparado ao grupo sem ciclosporina, porém sem diferenças com relação à sobrevivência (KIM, 1992). Esses mesmos autores estudaram a influência de várias dosagens de ciclosporina em ratos submetidos à hepatectomia parcial a 70%. Pré-terapia por 4 dias era realizada na dose de 10mg/Kg/dia via gavagem. Pós-hepatectomia, diferentes grupos com dosagens de 5, 10 e 20mg/Kg/dia foram avaliados. Nas duas dosagens mais baixas, o pico de mitose após a ressecção foi o dobro que o valor normal, entretanto, o grupo com 20mg/Kg/dia de ciclosporina teve seu pico suprimido. Outro trabalho desses mesmos autores também concluiu que a ciclosporina estimula a proliferação de hepatócitos em ratos após hepatectomia parcial (KIM, 1988a).

Kim *et al.* (1988b) também avaliaram o efeito da ciclosporina na proliferação dos hepatócitos após hepatectomia parcial em ratos e compararam com outras drogas imunossupressoras como a azatioprina e metilprednisolona. Foram avaliados parâmetros como taxa de mortalidade, restauração do peso hepático, características histológicas e mitóticas do fígado remanescente, bem como níveis séricos de transaminases, bilirrubinas e creatinina. A azatioprina e a metilprednisolona substancialmente suprimiram a proliferação dos hepatócitos quando comparadas ao grupo controle. Por outro lado, a ciclosporina A não inibiu, mas pode, de fato, ter estimulado a proliferação desses hepatócitos.

Kikuchi *et al.* (1993, 1994) também estudaram o efeito da ciclosporina na regeneração hepática de ratos submetidos à transplante hepático ortotópico de tamanho reduzido. Utilizaram dosagens de 3 mg/Kg/dia e 10mg/Kg/dia e evidenciaram que o enxerto hepático foi mais sensível tanto aos fatores hepatotróficos quanto aos hepatotóxicos da ciclosporina.

Nagayoshi *et al.* (2008) estudaram ratos submetidos à hepatectomia 70% divididos em três grupos, sendo o controle gavado com água e os dois grupos de estudo com 5mg/Kg/dia e 10mg/Kg/dia de ciclosporina respectivamente. Os ratos foram mortos com 1, 3, 7 e 14 dias pós-hepatectomia. Neste estudo a ciclosporina na dosagem de 5mg/Kg/dia não influenciou a regeneração hepática, mas a dosagem de 10mg/Kg/dia mostrou efeitos hepatotróficos significativos, sugerindo que esse fenômeno seja dose-dependente.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 COMISSÃO DE ÉTICA E PESQUISA

O projeto de pesquisa do presente estudo foi realizado de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e Lei Federal 6638, submetido, analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR (CEP/SD), em 09 de agosto de 2007, sob o registro CEP/SD: AN.007.003.07.07 (ANEXO 1).

#### 3.2 ANIMAIS

Neste estudo experimental foram utilizados 40 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*, *Roentia mammalia*) adultos, machos, provenientes do biotério de criação do Instituto Politécnico da Universidade Federal do Paraná (UFPR). O peso médio inicial dos animais foi 508 g ( $DP \pm 37.86$ ), variando de 418.9 g a 585 g.

#### 3.3 AMBIENTE E ALIMENTAÇÃO

O experimento foi realizado no Centro de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR, o qual conta com ambiente apropriado para manipulação dos animais e execução dos procedimentos cirúrgicos. Durante todo o período de estudo os animais permaneceram em ambiente com controle de temperatura ( $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), ruído e luminosidade (ciclos claro-escuro de 12 horas – *Cronomat*<sup>®</sup>, Mallory do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). As condições de higiene foram mantidas com troca diária das forrações de cepilho que acumulavam dejetos. Esses animais foram agrupados em número de 5, em gaiolas coletivas de aproximadamente 0,022 m<sup>3</sup> (41,4 cm x 34,4 cm x 16 cm). As gaiolas, em número total de 10, foram identificadas e acomodadas sobre estantes horizontais.

Durante todo o período de aclimação, que foi de 14 dias, e de estudo, os animais receberam água e ração balanceada *ad libitum*, padrão *Nuvilab CR1*<sup>®</sup>, produzido pela empresa Nuvital Nutrientes, Colombo, PR, Brasil (ANEXO 2).

### 3.4 GRUPOS

Após o período de aclimação, os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em 4 grupos de 10 ratos conforme a medicação utilizada e o dia da morte:

- **Grupo de estudo (E):** constituído por 20 animais que receberam ciclosporina desde o terceiro dia de pré-operatório até a morte, subdividindo-se em:
  - a-) E.24h:** constituído por 10 animais que receberam ciclosporina desde o terceiro dia de pré-operatório até a morte em 24 horas após a hepatectomia;
  - b-) E.7d:** constituído por 10 animais que receberam ciclosporina desde o terceiro dia de pré-operatório até a morte em 7 dias após a hepatectomia;
- **Grupo controle (C):** constituído por 20 animais que receberam solução salina isotônica de cloreto de sódio 0,9% desde o terceiro dia de pré-operatório até a morte, subdividindo-se em:
  - a-) C.24h:** constituído por 10 animais que receberam solução salina isotônica de cloreto de sódio 0,9% desde o terceiro dia de pré-operatório até a morte em 24 horas após a hepatectomia;
  - b-) C.7d:** constituído por 10 animais que receberam solução salina isotônica de cloreto de sódio 0,9% desde o terceiro dia de pré-operatório até a morte em 7 dias após a hepatectomia;

### 3.5 PESAGEM DOS ANIMAIS

A pesagem diária dos animais foi feita em balança modelo *AM 500 Marte®*, regulada nos padrões do Inmetro. Foram anotados os pesos de cada animal desde o terceiro dia de pós-operatório até a data da morte e registrados em planilha do programa *Microsoft Office Excel®* (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA). O peso diário foi usado para calcular a dose da medicação em estudo (10mg/Kg/dia). O peso final permitiu avaliar diferenças na perda de peso entre os grupos.

### 3.6 ADMINISTRAÇÃO DE CICLOSPORINA E SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA

Os animais foram apreendidos pela cauda, a fim de evitar trauma. Em seguida foram submetidos à anestesia inalatória com vaporizador de isoflurano

(Isoforine® - laboratório Cristália) na concentração de 1,5 a 3% e fluxo de oxigênio variando de 0,5 a 3L/min. Individualmente, cada rato foi colocado em campânula fechada através da qual o plano anestésico foi monitorado pelos movimentos voluntários e respiratórios do animal, sendo o mesmo retirado da campânula assim que apresentasse parada dos movimentos voluntários, preservando ainda os movimentos ventilatórios para o procedimento de pesagem diária e gavagem. Os ratos ainda anestesiados foram contidos com a mão esquerda do pesquisador, através da região dorsal do animal. Imobilização adequada e atraumática foi conseguida apoiando-se o segundo e terceiro dedos do pesquisador entre a cabeça e os membros anteriores do rato, e o primeiro e quarto dedos entre os membros posteriores e tronco anterior.

Cápsulas de ciclosporina microemulsão 100 mg (Sigma Pharma, Hortolândia, SP, Brasil) foram diluídos em óleo de oliva até a dosagem de 5mg/ml. Dose padronizada de 10 mg/kg/dia foi fornecida via sondagem orogástrica rígida aos animais dos grupos E.24h e E.7d. Nos grupos controle, utilizou-se solução salina isotônica de cloreto de sódio 0,9% (Baxter, São Paulo, SP, Brasil).

Conforme técnica descrita, o rato foi contido com a mão esquerda do pesquisador, enquanto na mão direita a sonda plástica rígida acoplada a uma seringa de 1 ml contendo a dose apropriada da solução foi introduzida até o ponto correspondente à distância entre a boca e o apêndice xifóide do animal (Figura 10A e 10B). Após lenta infusão da solução e retirada da sonda, a fim de diminuir o risco de regurgitação, o rato foi mantido com a porção cefálica mais elevada que a caudal até recuperar-se da anestesia.

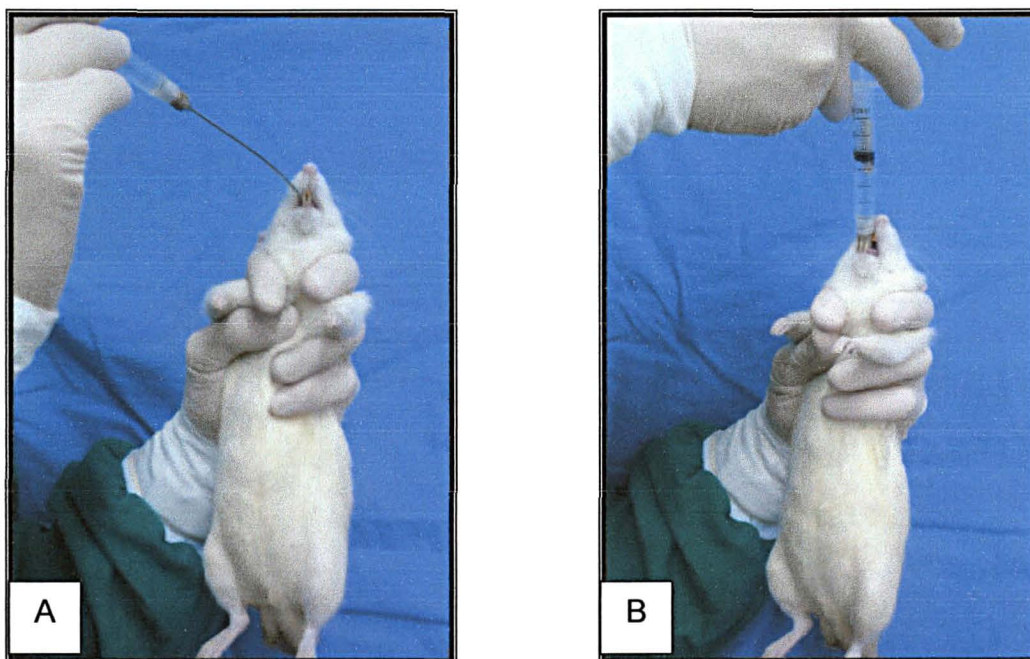


FIGURA 10 – ADMINISTRAÇÃO DA DROGA: (A) APREENSÃO DO RATO SEDADO E REALIZAÇÃO DE SONDAGEM OROGÁSTRICA COM CÂNULA PLÁSTICA RÍGIDA; (B) ADMINISTRAÇÃO DO VOLUME DE MEDICAÇÃO PREVIAMENTE ASPIRADO NA SERINGA

### 3.7 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais permaneceram em jejum 12 horas antes do procedimento cirúrgico. Após ser anestesiado, cada animal foi submetido à tricotomia da região ventral com barbeador elétrico (Figura 11), colocado em mesa cirúrgica apropriada, fixados os 4 membros, realizada a antisepsia com solução tópica de polivinilpirrolidona-iodo (PVPI) e coberto com campos estéreis.





FIGURA 11 – TRICOTOMIA DA REGIÃO VENTRAL COM APARELHO DE TOSA, SOB EFEITO DE ANESTESIA

A equipe foi composta de um único cirurgião (o pesquisador), um auxiliar responsável pelo monitoramento do plano anestésico do animal e o orientador da pesquisa. O procedimento cirúrgico consistiu em realizar a laparotomia mediana de 4cm com tesoura de Metzembaun a partir do apêndice xifóide, abertura por planos, liberação dos ligamentos hepáticos e a ressecção dos segmentos lateral esquerdo e mediano do fígado correspondendo à 70% da massa hepática total com ligadura de monocril 3-0 (Figura 12A a 12F).

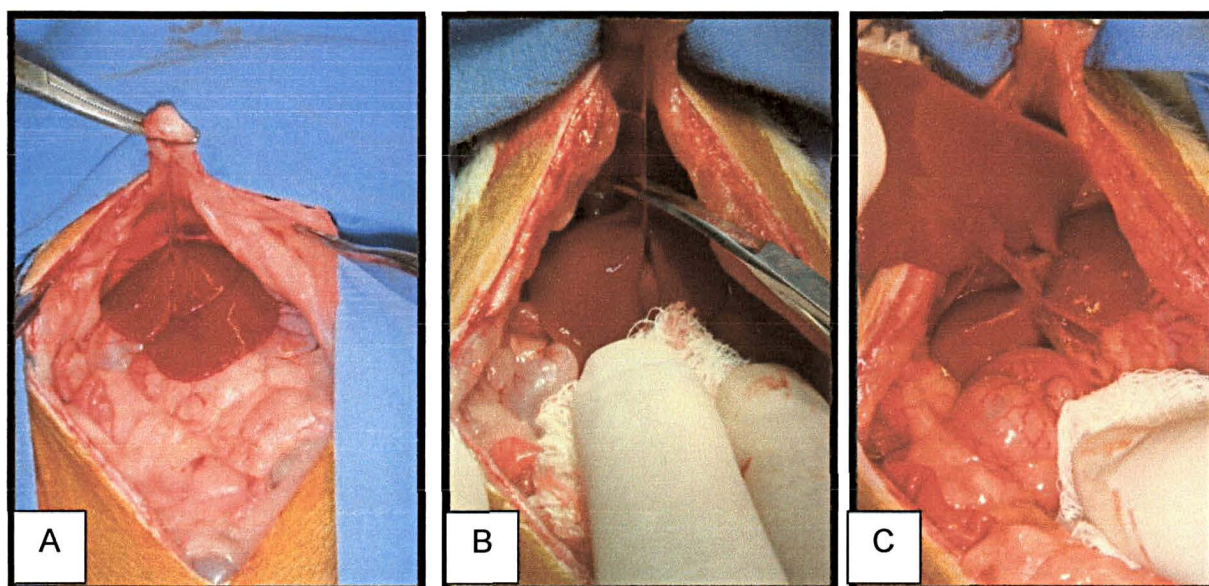


FIGURA 12 – PROCEDIMENTO CIRÚRGICO: (A) VISÃO DO FÍGADO; (B) LIBERAÇÃO DOS LIGAMENTOS CIRCUNDANTES DO FÍGADO; (C) IDENTIFICAÇÃO DOS LOBOS A SEREM RESSECADOS.



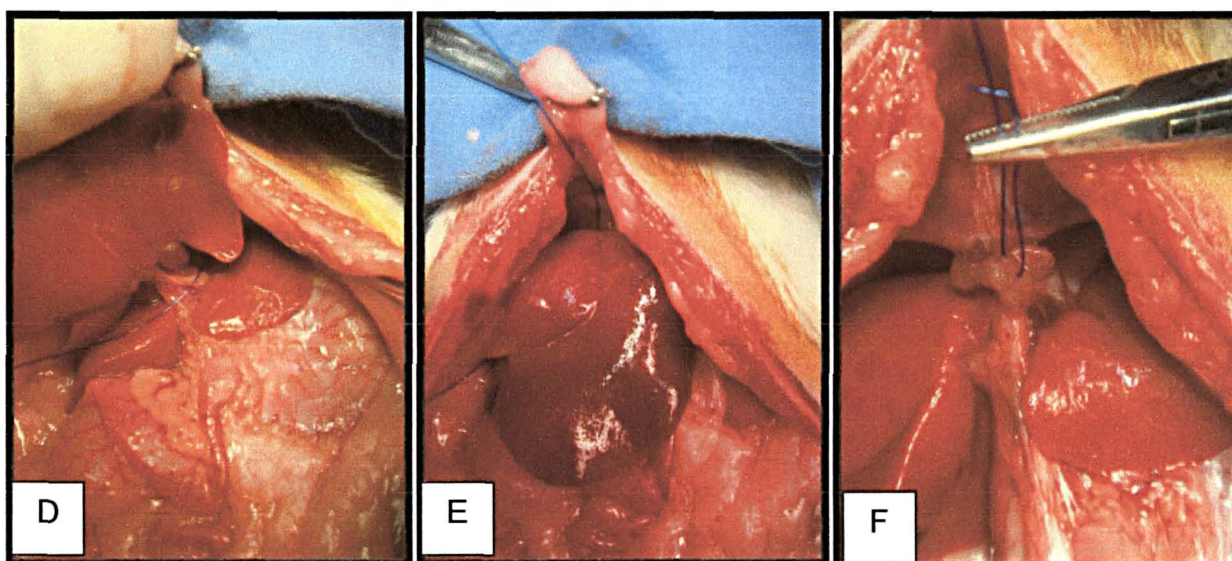


FIGURA 12 – PROCEDIMENTO CIRÚRGICO: (D) LIGADURA DOS LOBOS LATERAL ESQUERDO E MEDIANO; (E) VISÃO FRONTAL DA LIGADURA; (F) ASPECTO FINAL APÓS A RESSECÇÃO DE 70% DA MASSA HEPÁTICA

O fechamento da laparotomia foi realizado com sutura contínua de prolene 3-0. O espécime ressecado foi pesado para posterior cálculo da regeneração hepática pela fórmula de Kwon e em seguida desprezado.

A documentação fotográfica foi realizada com câmera digital Sony® modelo Cyber-shot DSC-T10 (Sony, Tokyo, Japão), com resolução de 7.2 megapixels.

### 3.8 MORTE

No 1º de dia pós-operatório, 10 animais do grupo E.24h e 10 do grupo C.24h foram submetidos à morte por dose letal de éter etílico inalatório em campânula de vidro (Figura 13A). Logo em seguida o rato foi pesado, colocado em decúbito dorsal, realizada antissepsia, colocação de campos estéreis e aberta a incisão prévia (Figura 13B).

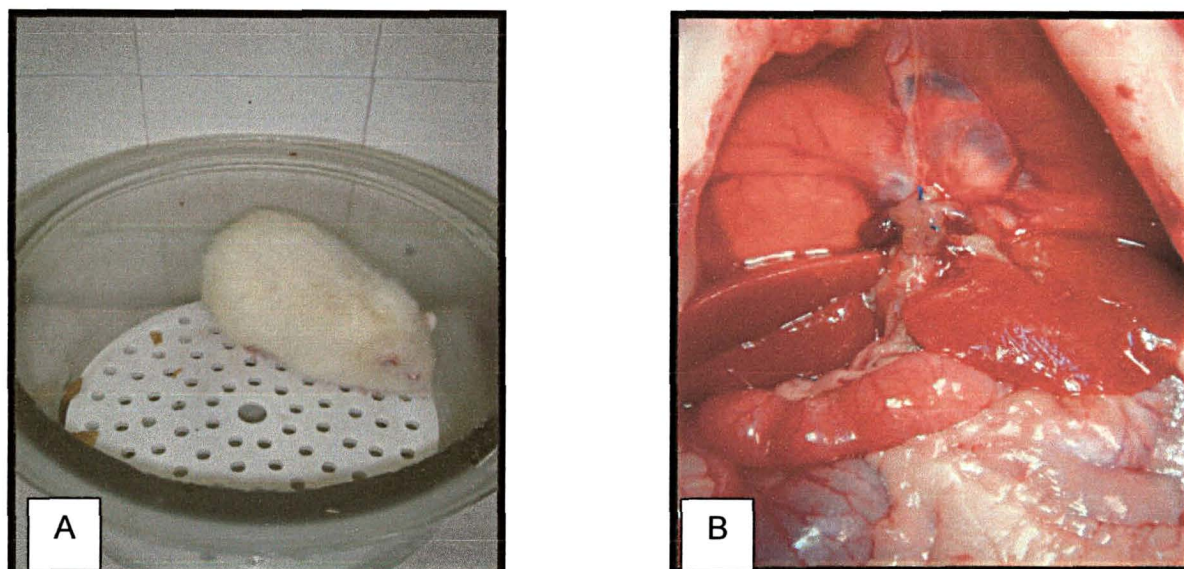


FIGURA 13 – RESSECÇÃO DO FÍGADO REGENERADO NO 1º OU 7º DIA APÓS HEPATECTOMIA À 70%: (A) MORTE POR DOSE LETAL DE ÉTER EM CAMPÂNULA DE VIDRO; (B) ABERTURA DA LAPAROTOMIA PRÉVIA

Após a retirada cuidadosa dos pontos da laparotomia mediana, realizou-se inspeção da cavidade para lise de bridas e documentação fotográfica do fígado regenerado. Realizou-se a liberação de todo o fígado e secção das veias supra-hepáticas, porta e cava inferior (Figura 14A a 14C). O fígado retirado foi pesado e para estudo histológico foi ressecada uma porção do segmento superior do lobo direito. Os espécimes ressecados no momento da morte foram armazenados em solução de formalina 10% (Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil) após cálculo da porcentagem de regeneração hepática pela fórmula de Kwon.



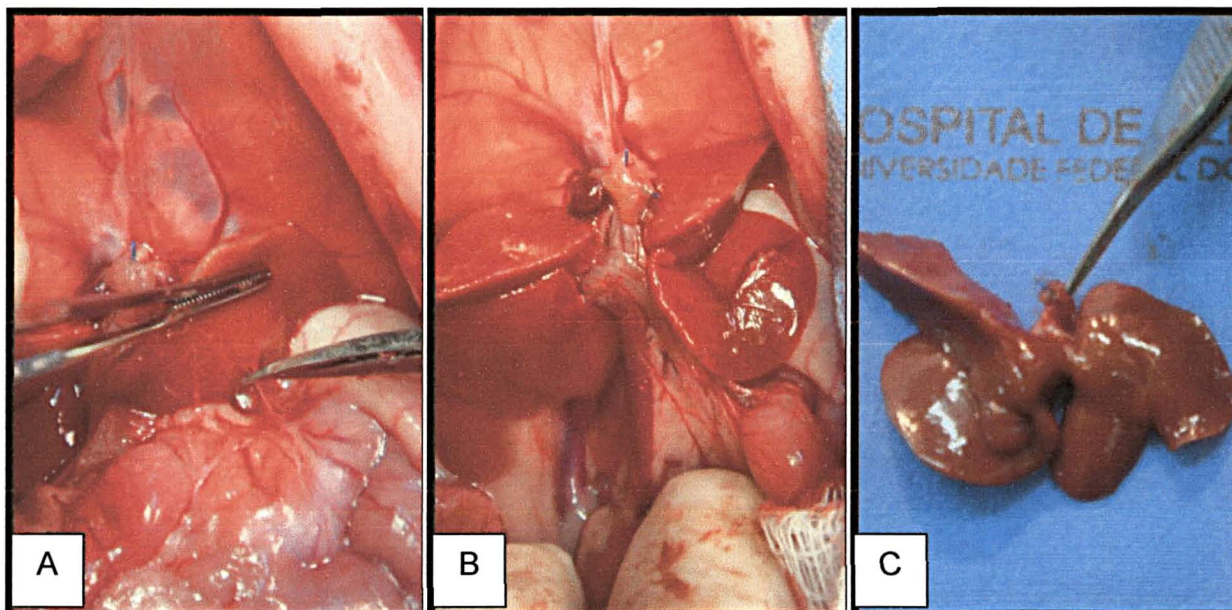


FIGURA 14 – RESSECÇÃO DO FÍGADO REGENERADO NO 1º OU 7º DIA APÓS HEPATECTOMIA À 70%: (A) LIBERAÇÃO DAS ADERÊNCIAS; (B) IDENTIFICAÇÃO DOS LOBOS REMANESCENTES COM SECÇÃO DE SUA VASCULARIZAÇÃO; (C) PEÇA HEPÁTICA REGENERADA RESSECADA

O estudo anátomo-patológico das peças foi realizado através da coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) para cálculo do índice mitótico e análise imunoistoquímica com Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) e Ki-67.

### 3.9 ANÁLISE DO PESO CORPORAL

Foram analisados os dados referentes aos pesos corporais iniciais, ou seja, no terceiro dia de pré-operatório, no dia da hepatectomia e na data da morte. Nos grupos com morte 7 dias após a hepatectomia, avaliaram-se os pesos no segundo e quarto dias de pós-operatório. Esses dados foram comparados entre os grupos de estudo (E.24h X E.7d) e também entre os grupos controle (C.24h X C.7d) com médias e desvio padrão.

### 3.10 ANÁLISE DO PESO DO FÍGADO RESSECADO E REGENERADO

Foram analisados os dados referentes aos pesos dos espécimes ressecados na hepatectomia, aos pesos estimados do fígado remanescente na data da hepatectomia e ao peso total estimado do fígado na data da ressecção. Foram

também avaliados os pesos do fígado no momento da morte e a relação do peso hepático estimado no dia da hepatectomia e da morte com o peso corporal do animal no respectivo momento. Esses dados foram comparados entre os grupos de estudo (E.24h X E.7d) e também entre os grupos controle (C.24h X C.7d) com médias e desvio padrão.

### 3.11 CÁLCULO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON

Logo após a morte dos animais, calculou-se a regeneração hepática de cada grupo pela fórmula de Kwon (KWON, 1990). Esta fórmula fornece a taxa de regeneração baseada no peso:

$$\% = D/E \times 100$$

Onde  $E = R/0,7$ ;

D = peso do fígado por 100 gramas de peso do animal no dia da morte;

E = representa o peso estimado por 100 gramas de peso do animal antes da hepatectomia, a qual é calculada pelo peso do fígado ressecado (R).

### 3.12 DETERMINAÇÃO DA REGENERAÇÃO PELO ÍNDICE MITÓTICO (HE)

Para avaliação da regeneração hepática utilizando-se o índice mitótico, um fragmento da porção superior do lobo direito após a morte de cada animal foi colocado em frasco contendo formalina 10% e enviado ao Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR. As amostragens macroscópicas foram padronizadas para todos os espécimes, realizando-se cortes transversais na porção média do fragmento hepático. Após desidratação, diafanização e embocamento dos tecidos em parafina, foram realizadas microtomias de 4  $\mu$ m e coloração com Hematoxilina-Eosina.

Analísaram-se os cortes histológicos com microscópio óptico. As imagens foram captadas por câmera fotográfica, transmitidas a monitor colorido, congeladas e digitalizadas por meio de placas de *Oculus TCX*<sup>®</sup>. Analísaram-se 10 campos de grande aumento (400X) de maneira aleatória, sendo as figuras de mitose registradas e fotografadas (Figura 15A e 15B).

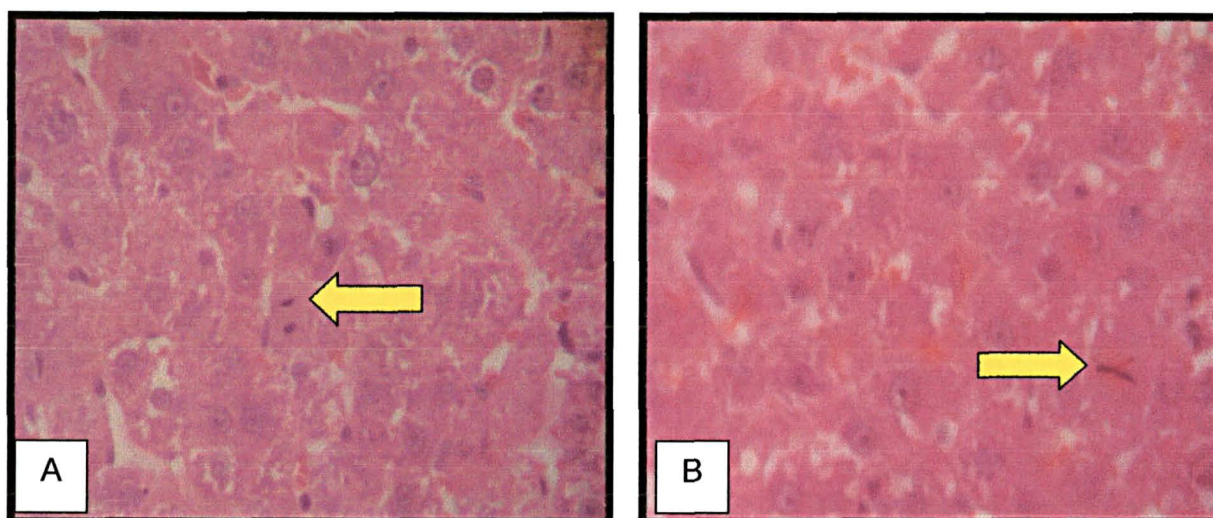


FIGURA 15 – (A e B) FOTOMICROGRAFIA REVELANDO FIGURAS DE MITOSE (SETAS) (HE, X400)

### 3.13 COLORAÇÃO PELA IMUNOHISTOQUÍMICA COM PCNA

O estudo imunoistoquímico foi desenvolvido no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR. Foram utilizadas lâminas silanizadas para evitar o descolamento dos cortes histológicos durante a coloração. As peças foram desparafinizadas e reidratadas em concentrações adequadas de etanol e água destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com a utilização de água oxigenada ( $H_2O_2$ ) a 3% por 5 minutos, seguido por uma breve rinsagem em água destilada e lavagem de 15 minutos em PBS. As peças foram então colocadas em um tampão de citrato com pH de 6,0 e então aquecidas em forno de microondas a  $98^{\circ}C$  por 5 minutos para o PCNA. Após, as peças foram resfriadas à temperatura ambiente por 20 minutos e rinsadas em PBS. Anticorpos primários anti-PCNA (Monoclonal, Código M0879, Dako, Carpinteria, USA) foram aplicados “overnight” à temperatura de  $2^{\circ}C$  a  $8^{\circ}C$ . Após banho em tampão fosfato, seguiu-se à aplicação de anticorpo biotilado por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após novo banho em tampão fosfato, seguiu-se à aplicação do complexo estreptavidina – peroxidase por 30 minutos, ainda à temperatura ambiente. Foi então realizado mais um banho em tampão fosfato e revelação da reação imune com Diaminobenzidina, seguido de contra-coloração com Hematoxilina. Na seqüência, os cortes foram desidratados e montados com bálsamo e lamínulas de vidro.



Analisaram-se os cortes histológicos com microscópio óptico. As imagens foram captadas por câmera fotográfica, transmitidas a monitor colorido, congeladas e digitalizadas por meio de placas de *Oculus TCX*<sup>®</sup>.

A positividade da coloração imunoistoquímica foi identificada nas áreas de pigmentação acastanhada. Controles positivos e negativos foram utilizados. As lâminas foram avaliadas sem a identificação dos grupos dos animais. Foram analisados 100 hepatócitos de maneira aleatória e considerados positivos os que coraram-se moderada ou fortemente e, deste modo, efetuada a porcentagem de células positivas (Figura 16A e 16B).

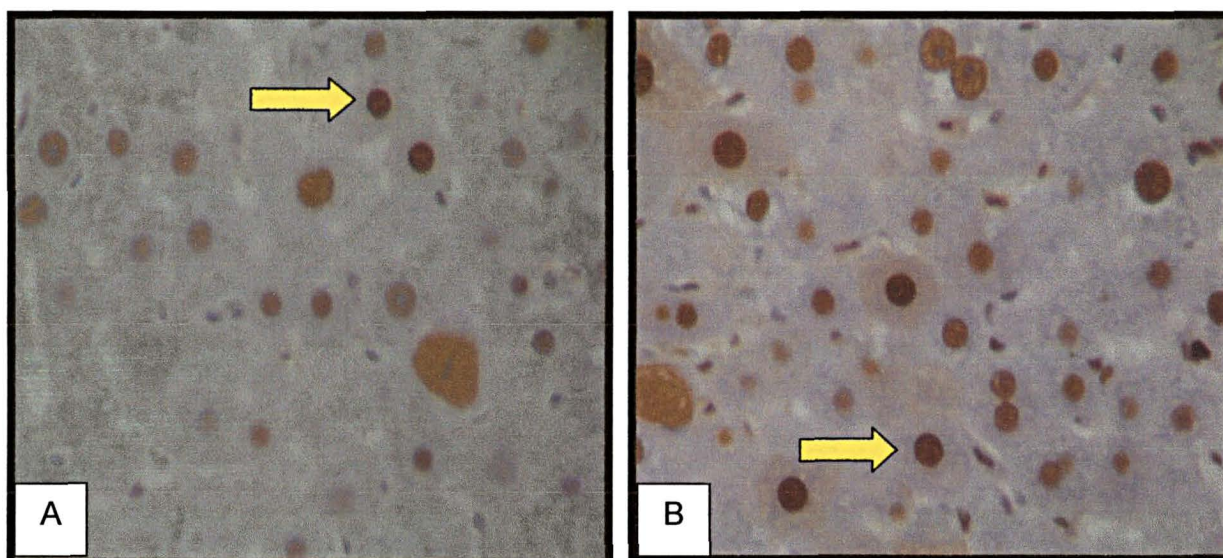


FIGURA 16 – (A e B) FOTOMICROGRAFIA REVELANDO POSITIVIDADE NUCLEAR PARA PCNA (SETAS) (IMUNOISTOQUÍMICA, X400)

### 3.14 COLORAÇÃO PELA IMUNOISTOQUÍMICA COM KI-67

O estudo imunoistoquímico foi desenvolvido no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR. Foram utilizadas lâminas silanizadas para evitar o descolamento dos cortes histológicos durante a coloração. As peças foram desparafinizadas e reidratadas em concentrações adequadas de etanol e água destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com a utilização de água oxigenada ( $H_2O_2$ ) a 3% por 5 minutos, seguido por uma breve rinsagem em água destilada e lavagem de 15 minutos em PBS. As peças foram então colocadas em um tampão de citrato com pH de 6,0 e então aquecidas em forno de microondas a 98<sup>o</sup> C por 30 minutos para o Ki-67. Após, as peças foram resfriadas à temperatura

ambiente por 20 minutos e rinsadas em PBS. Anticorpos primários anti-Ki67 (Monoclonal, Código NCL-Ki-67-MM1, Clone MM1, Novocastra, USA) foram aplicados “*overnight*” à temperatura de 2° C à 8° C. Após banho em tampão fosfato, seguiu-se à aplicação de anticorpo biotinilado por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após novo banho em tampão fosfato, seguiu-se à aplicação do complexo estreptavidina – peroxidase por 30 minutos, ainda à temperatura ambiente. Foi então realizado mais um banho em tampão fosfato e revelação da reação imune com Diaminobenzidina, seguido de contra-coloração com Hematoxilina. Na seqüência , os cortes foram desidratados e montados com bálsamo e lamínulas de vidro.

Analisaram-se os cortes histológicos com microscópio óptico. As imagens foram captadas por câmera fotográfica, transmitidas a monitor colorido, congeladas e digitalizadas por meio de placas de *Oculus TCX*®.

A positividade da coloração imunoistoquímica foi identificada nas áreas de pigmentação acastanhada. Controles positivos e negativos foram utilizados. As lâminas foram avaliadas sem a identificação dos grupos dos animais. Foram analisados 100 hepatócitos de maneira aleatória e considerados positivos os que coraram-se moderada ou fortemente e, deste modo, efetuada a porcentagem de células positivas (Figura 17A e 17B).

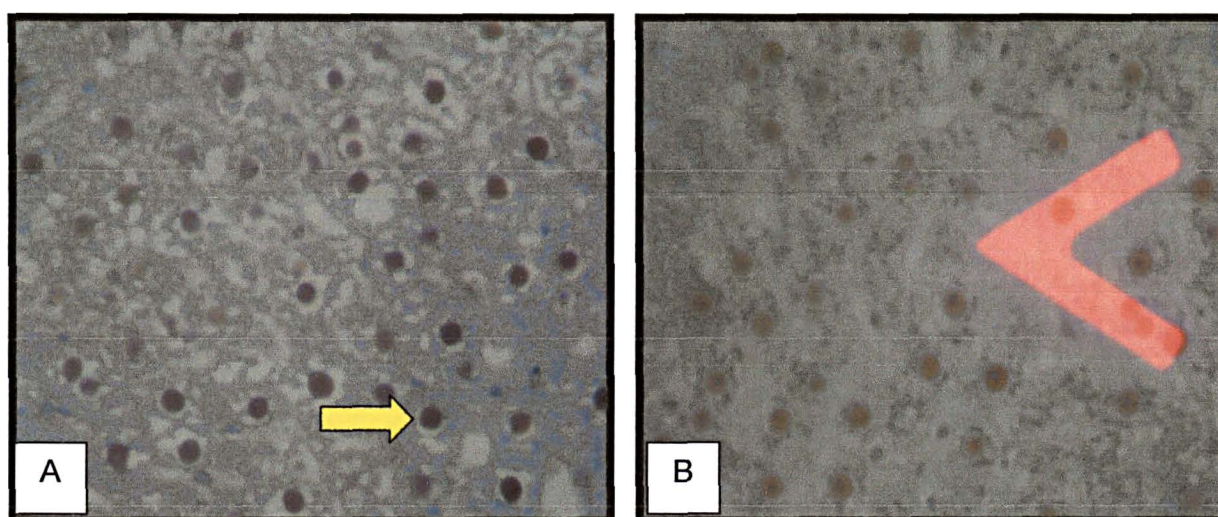


FIGURA 17 – FOTOMICROGRAFIA REVELANDO POSITIVIDADE NUCLEAR PARA Ki-67 (A) E NEGATIVIDADE PARA Ki-67 (B) (SETAS) (IMUNOISTOQUÍMICA, X400)

### 3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA



Todos os dados foram tabulados em planilha do programa *Microsoft Office Excel*<sup>®</sup> (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA) (APÊNDICES 1-6), obtendo-se os valores médios (M), mediana, desvio padrão (DP) para cada variável nos diferentes tempos estudados.

Procedeu-se ao tratamento estatístico julgado adequado conforme a natureza dos dados analisados nos grupos controle e estudo, nos períodos 24 horas e 7 dias para as variáveis: pesos corporais (g) inicial; nos dias da hepatectomia e da morte; intermediários nos 2º e 4º dias pós-operatórios (7 dias); variação dos pesos corporais (g) inicial e no dia da morte; pesos do fígado (g) estimado restante, ressecado e total estimado, no dia da hepatectomia; peso do fígado (g) no dia da morte; relação do peso total estimado do fígado (g) no dia da hepatectomia e do peso do animal (g) no mesmo momento; relação do peso total do fígado (g) no dia da morte e do peso do animal (g) no mesmo momento; porcentagem de regeneração do fígado pela fórmula de Kwon; porcentagem do Ki67; porcentagem do PCNA; porcentagem do índice mitótico. Observou-se o pré-requisito da distribuição normal (Gaussiana) das variáveis para a escolha do teste estatístico. Na análise não-paramétrica foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* para as comparações: pesos corporais (g) inicial e no dia da morte no grupo controle no período 7 dias; variação dos pesos corporais inicial e no dia da morte (g) dentro dos grupos; peso corporal (g) no dia da morte entre os grupos no período 24 horas; relação do peso total estimado do fígado (g) no dia da hepatectomia e do peso do animal (g) no mesmo momento entre os grupos nos períodos 24 horas e 7 dias; relação do peso total do fígado (g) no dia da morte e do peso do animal (g) no mesmo momento no período 24 horas; porcentagem do Ki67 dentro do grupo estudo e entre os grupos no período 7 dias; porcentagem do índice mitótico entre os grupos no período 24 horas. Nos demais resultados utilizou-se a análise paramétrica com o teste "*t*" de *Student*. Para todos os testes estatísticos o nível de significância adotado foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ).



## 4 RESULTADOS

### 4.1 PESOS DOS ANIMAIS

Houve perda ponderal significativa nos grupos comparando-se o peso inicial com o peso no dia da morte dos animais (Gráfico 1).

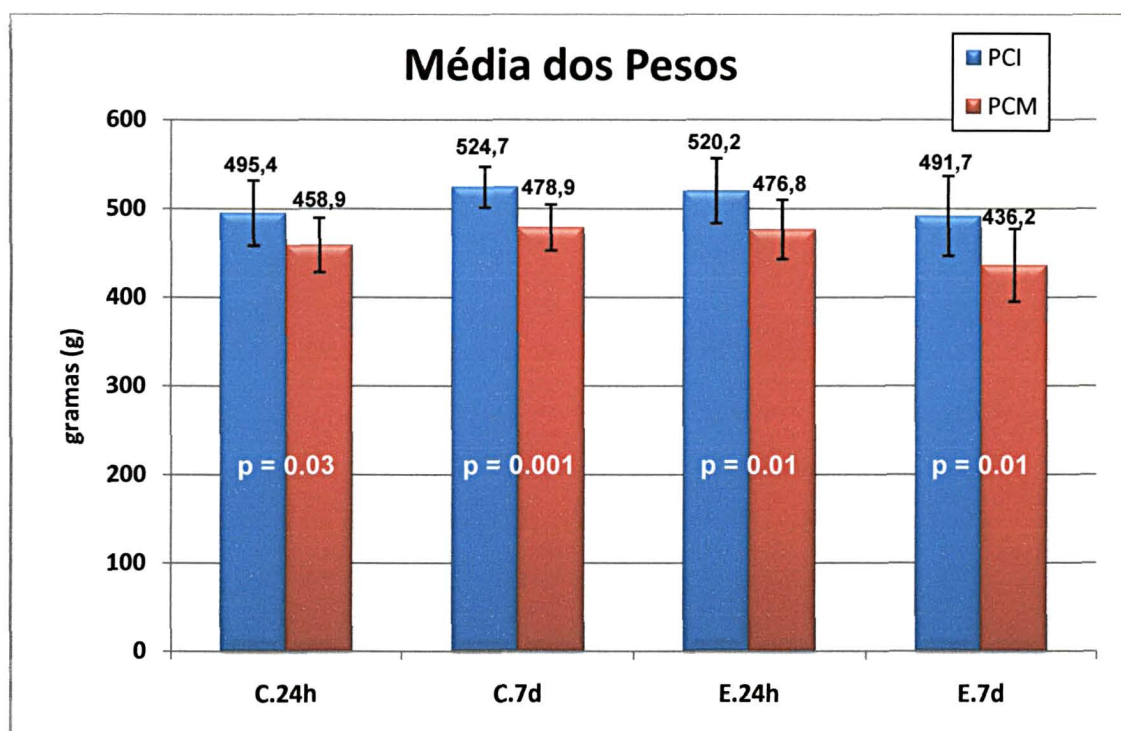


GRÁFICO 1 – MÉDIA DOS PESOS INICIAL E NA MORTE EM CADA GRUPO  $\pm$  DESVIO PADRÃO. C.24h: GRUPO CONTROLE 24 HORAS; C.7d: GRUPO CONTROLE 7 DIAS; E.24h: GRUPO ESTUDO 24 HORAS; E.7d: GRUPO ESTUDO 7 DIAS; PCI: PESO CORPORAL INICIAL; PCM: PESO CORPORAL NA MORTE. COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE OS GRUPOS ( $p$ )

Quando comparadas as médias das variações dos pesos corporal inicial e no dia da morte dentro do grupo controle (24 horas e 7 dias) e do grupo de estudo (24 horas e 7 dias), houve significância estatística apenas entre os últimos ( $p=0,01$ ) (Tabela 1).

TABELA 1– ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA VARIAÇÃO DOS PESOS CORPORAIS INICIAL E NO DIA DA MORTE DENTRO DOS GRUPOS CONTROLE 24 HORAS E 7 DIAS E GRUPOS ESTUDO 24 HORAS E 7 DIAS

GRUPOS	VARIAÇÃO DOS PESOS CORPORAIS INICIAL E NO DIA DA MORTE (g)			p
	média	±	dp	
Controle 24 horas	36,5	±	8,7	0,20
Controle 7 dias	45,8	±	12,3	
Estudo 24 horas	43,3	±	5,6	0,01
Estudo 7 dias	55,5	±	11,8	

Nota: dp – desvio-padrão, p – nível de significância estatística

Na comparação intergrupos dos pesos dos animais no dia do início, no dia da hepatectomia e no dia da morte, houve variação estatisticamente significativa entre os grupos de 7 dias controle e estudo nos momentos inicial ( $p = 0,05$ ) e no dia da morte ( $p = 0,02$ ), sendo que os animais que receberam imunossupressão com ciclosporina tinham os menores valores ponderais nas duas ocasiões (Tabela 2).

TABELA 2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA INTERGRUPOS (CONTROLE X ESTUDO) DAS MÉDIAS DO PESO CORPORAL INICIAL, NO DIA DA HEPATECTOMIA E NO DIA DA MORTE NOS PERÍODOS 24 HORAS E 7 DIAS

GRUPOS	INICIAL (g)			p	HEPATECTOMIA (g)			p	MORTE (g)			p
	média	±	dp		média	±	dp		média	±	dp	
Controle 24 horas	495,4	±	36,8	0,15	476,1	±	33,7	0,24	458,9	±	30,6	0,23
Estudo 24 horas	520,2	±	36,8		495,4	±	36,7		476,8	±	33,6	
Controle 7 dias	524,7	±	23,0	0,05	510,5	±	24,6	0,06	478,9	±	25,9	0,02
Estudo 7 dias	491,7	±	45,0		478,9	±	43,6		436,2	±	41,1	

Nota: dp – desvio-padrão, p – nível de significância estatística

Com relação aos grupos de 7 dias, foram realizadas aferições de peso corporal chamadas de intermediárias, ou seja, no segundo e quarto dias após a hepatectomia 70%. Ao compararmos os grupos controle com o estudo de 7 dias no segundo e no quarto dias, ambos apresentaram diferenças estatisticamente significativas, com perda de peso mais acentuada no grupo em que utilizou-se o imunossupressor (Gráfico 2).

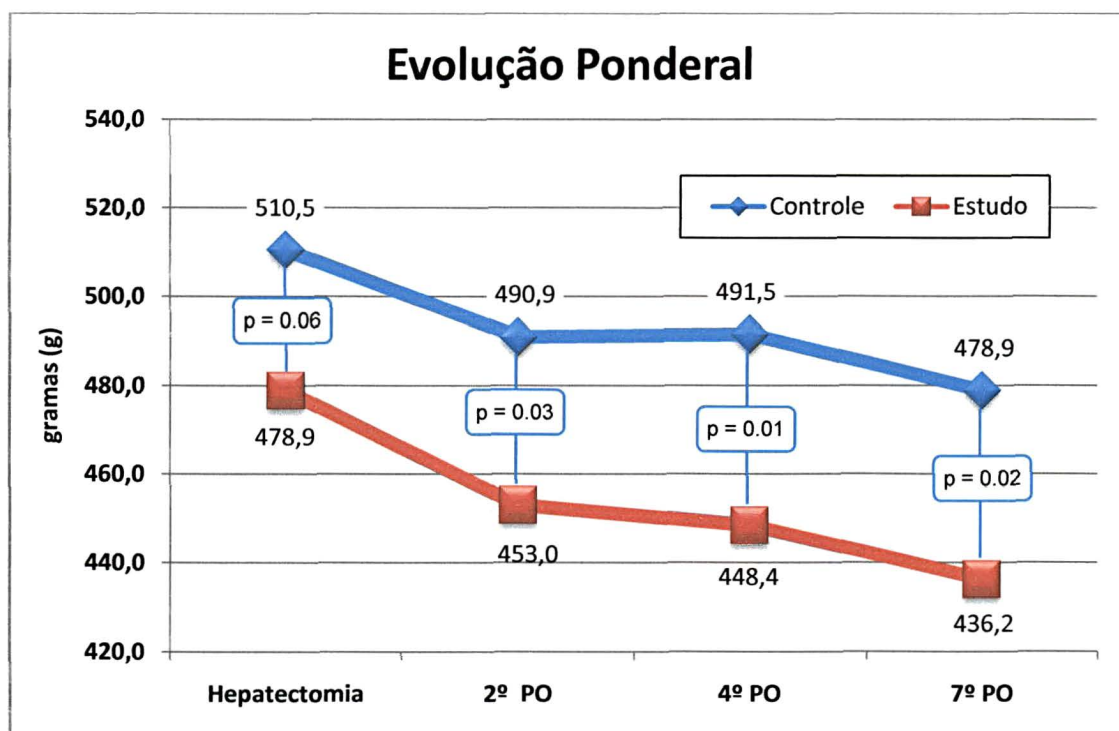


GRÁFICO 2 – EVOLUÇÃO PONDERAL NOS GRUPOS CONTROLE E ESTUDO AO LONGO DA PESQUISA. COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS ( $p$ )

#### 4.2 PESOS DO FÍGADO

No momento da hepatectomia 70%, comparando-se o peso estimado do fígado restante, do fígado ressecado e do peso total hepático entre os grupos controle e de estudo, nenhum apresentou diferença estatisticamente significativa (Tabela 3).

TABELA 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DO PESO ESTIMADO DO FÍGADO RESSECADO, PESO ESTIMADO DO FÍGADO RESTANTE E DO PESO TOTAL ESTIMADO DO FÍGADO NO DIA DA HEPATECTOMIA ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ESTUDO NOS PERÍODOS 24 HORAS E 7 DIAS

GRUPOS	RESSECADO (g)			REST. ESTIMADO (g)			TOTAL ESTIMADO (g)		
	média	dp	p	média	dp	p	média	dp	p
Controle 24 horas	8,7	± 0,9	0,87	3,7	± 0,4	0,89	12,4	± 1,3	0,88
Estudo 24 horas	8,6	± 1,3		3,7	± 0,5		12,3	± 1,8	
Controle 7 dias	8,9	± 1,0	0,37	3,8	± 0,4	0,34	12,7	± 1,5	0,38
Estudo 7 dias	8,4	± 1,2		3,6	± 0,5		12,1	± 1,8	

Nota: dp – desvio-padrão, p – nível de significância estatística

### 4.3 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON

A regeneração hepática avaliada pela fórmula de Kwon mostrou crescimento estatisticamente significativo do remanescente hepático nos dois grupos, nas primeiras 24 horas e no sétimo dia pós-hepatectomia. Na comparação intergrupos, os animais que receberam ciclosporina durante sete dias (subgrupo E.7d) mostraram o maior índice de regeneração hepática, atingindo significância estatística quando comparado ao grupo de animais mantidos 7 dias com placebo ( $p = 0,05$ ) (Gráfico 3).

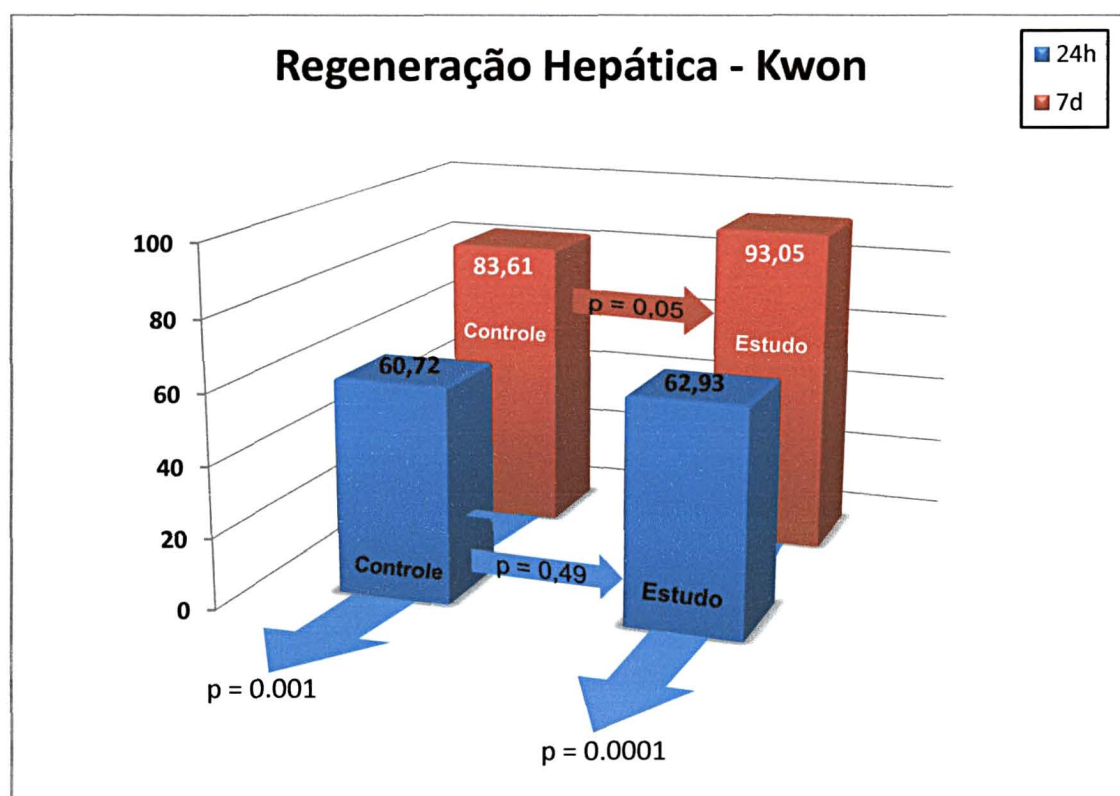


GRÁFICO 3 – AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON. COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS INTRA E INTERGRUPOS NOS SUBGRUPOS DE 24 HORAS. 24h: EM AZUL OS GRUPOS DE 24 HORAS. 7d: EM VERMELHO OS GRUPOS DE 7 DIAS. COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS ( $p$ )

#### 4.4 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO ÍNDICE MITÓTICO

Na avaliação do índice mitótico pela coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), a diferença estatística foi observada no grupo controle entre os dois períodos ( $p=0,006$ ) e também no grupo de estudo entre os mesmos períodos. Na comparação intergrupos, não houve diferença estatística significativa em nenhum dos dois momentos (Gráfico 4).

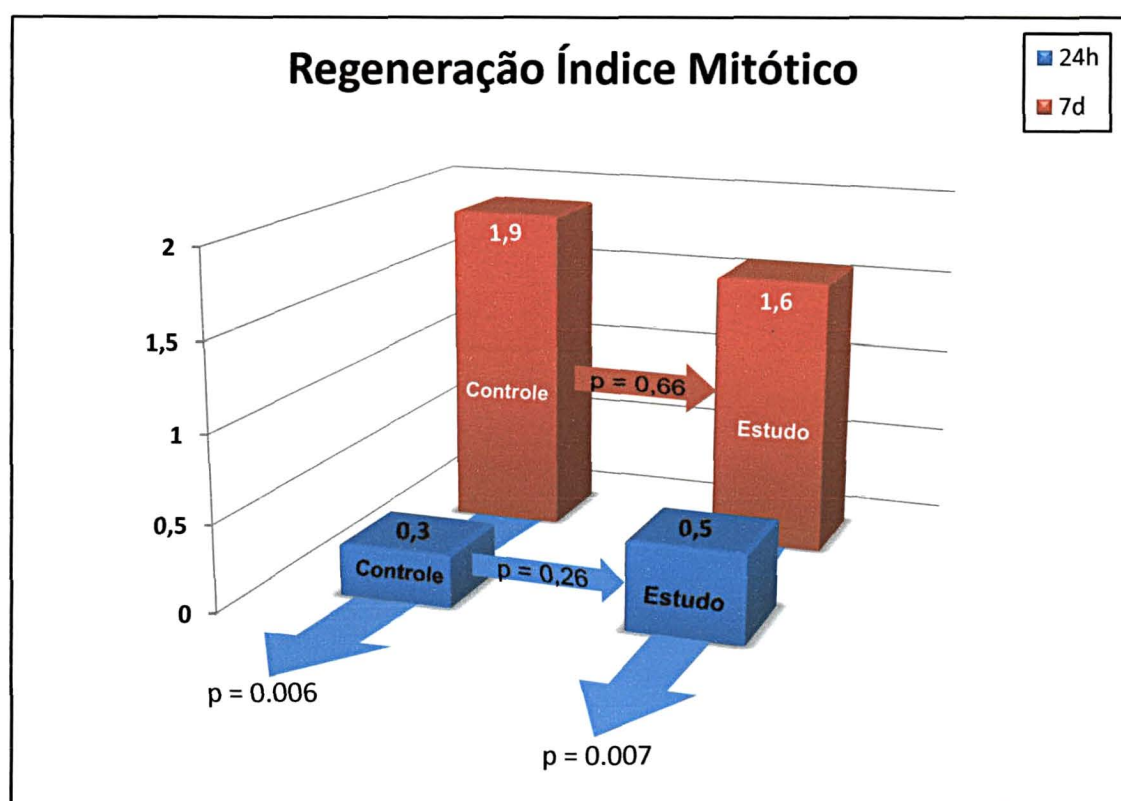


GRÁFICO 4 – AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA INTRA E INTERGRUPOS ATRAVÉS DO ÍNDICE MITÓTICO. COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS ( $p$ )

#### 4.5 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO PCNA

Com relação ao outro anticorpo, o PCNA, apenas a comparação entre os períodos do grupo de estudo observou-se diferença estatística ( $p=0,0001$ ) (Tabela 4).



TABELA 4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA PORCENTAGEM DO PCNA INTRA E INTERGRUPOS NOS PERÍODOS 24 HORAS E 7 DIAS

GRUPOS			PORCENTAGEM DO PCNA			p
			média ± dp	x	média ± dp	
Controle 24 horas	x	Controle 7 dias	67,4 ± 17,6	x	57,9 ± 22,2	0,30
Estudo 24 horas	x	Estudo 7 dias	74,3 ± 13,4	x	42,3 ± 15,6	0,0001
Controle 24 horas	x	Estudo 24 horas	67,4 ± 17,6	x	74,3 ± 13,4	0,34
Controle 7 dias	x	Estudo 7 dias	57,9 ± 22,2	x	42,3 ± 15,6	0,09

Nota: dp – desvio-padrão, p – nível de significância estatística

#### 4.6 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO Ki-67

Com relação ao antígeno Ki-67, a análise estatística dentro e entre os grupos controle e de estudo nos períodos de 24 horas e 7 dias, a única estatisticamente significativa foi a do grupo de estudo entre os dois períodos ( $p=0,04$ ) (Tabela 5).

TABELA 5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA PORCENTAGEM DO Ki67 INTRA E INTERGRUPOS NOS PERÍODOS 24 HORAS E 7 DIAS

GRUPOS			PORCENTAGEM DO Ki67			p
			média ± dp	x	média ± dp	
Controle 24 horas	x	Controle 7 dias	58,3 ± 19,8	x	44,7 ± 18,0	0,12
Estudo 24 horas	x	Estudo 7 dias	65,2 ± 24,2	x	41,5 ± 27,6	0,04
Controle 24 horas	x	Estudo 24 horas	58,3 ± 19,8	x	65,2 ± 24,2	0,49
Controle 7 dias	x	Estudo 7 dias	44,7 ± 18,0	x	41,5 ± 27,6	0,70

Nota: dp – desvio-padrão, p – nível de significância estatística

## 5 DISCUSSÃO

Do ponto de vista experimental, para estudar a regeneração do fígado, a grande maioria dos pesquisadores opta pelo estímulo do tipo ressecção hepática, onde a massa hepática remanescente é normal, valendo-se, para tal, do modelo de hepatectomia parcial à 70% descrito em ratos por Higgins e Anderson em 1931. Este mesmo modelo experimental foi escolhido para o atual estudo por se tratar de ato operatório relativamente simples, de fácil reprodução e muito baixa mortalidade, em animal resistente, de fácil manipulação e economicamente viável em nosso meio. Com raras exceções, para estudos experimentais em animais envolvendo o fenômeno da regeneração hepática, utilizam-se animais jovens, ainda em fase de crescimento (TANNURI, 2008a, 2008b, 2008c), como por exemplo, ratos com peso em torno de 200 a 250 gramas, ou até mesmo recém-natos com peso de 30 a 50 gramas. Neste estudo, utilizamos deliberadamente ratos *Wistar* completamente desenvolvidos, com pesos acima de 350 gramas, para podermos analisar o fenômeno da regeneração hepática na ausência de mecanismos humorais, gerais e específicos, que estivessem em plena atividade, induzindo a divisão celular em vários tecidos e órgãos. Desta maneira, o grau de regeneração hepática mensurado se devia única e exclusivamente ao estímulo da hepatectomia parcial realizada.

Estudos têm mostrado aumento na proliferação hepatocitária, utilizando a ciclosporina em esquema de pré-terapia (KIM, 1993; DAOUDAKI, 2003), influenciando de maneira positiva o processo de regeneração hepática após hepatectomia a 70% (FRANCAVILLA, 1990a, 1990b; MAZZAFERRO, 1990; KAHN, 1990; TANAKA, 1993). Entretanto, outros estudos não comprovaram este fato (PROVENCHER, 1997, 1999). Vistas as propriedades imunossupressoras da ciclosporina e os efeitos potencialmente positivos na regeneração hepática demonstrados em parte dos estudos, a possibilidade de sua utilização com a finalidade de aumentar a proliferação hepatocitária em ressecções hepáticas, transplante de fígado intervivos e *split-livers*, surge como hipótese a ser pesquisada.

No grupo de estudo deste trabalho utilizou-se a pré-terapia com ciclosporina diária por gavagem desde o terceiro dia pré-operatório até a morte dos animais em 24 horas ou sete dias após a ressecção hepática. Esta técnica de pré-terapia com gavagem foi descrita por vários autores (KIM, 1988a, 1988b, 1990, 1992, 1993; DAOUDAKI, 2003). Justifica-se tal estratégia pela rapidez com que se processa o

fenômeno de regeneração hepática no rato, com a maioria das modificações fundamentais já estabelecidas no prazo de 24 horas.

No presente estudo, investigou-se a interferência da ciclosporina no processo de regeneração hepática em ratos. Observa-se grande variação na utilização da ciclosporina em diferentes estudos experimentais, tanto em relação à via de administração, quanto à dosagem utilizada. No presente estudo, utilizou-se uma das posologias mais freqüentemente encontradas nos relatos da literatura (KIKUCHI, 1993, 1994; KIM, 1988a, 1988b, 1990, 1992, 1993). Optamos por realizar diluição da apresentação comercialmente disponível (Ciclosporina em microemulsão® – Sigma Pharma, São Paulo) e administração diária matinal através de sondagem orogástrica, sob sedação inalatória, devido à comprovada eficácia e biodisponibilidade desta droga por via oral quando utilizada em dose única diária de 10mg/Kg/dia. Este método garantiu completa administração da dosagem adequada calculada para cada animal, levando-se sempre em consideração a variação do peso corporal ao longo de todo o experimento.

Todos os animais dos 4 grupos perderam peso desde o início da gavagem até a data da morte de maneira estatisticamente significativa. Quando comparadas essas médias de peso inicial e na data da morte intragrupo, apenas entre os grupos de estudo é que observamos diferença estatística ( $p=0,01$ ), significando que a ciclosporina pode ter causado diminuição do peso do animal no decorrer do experimento. Se compararmos os grupos de 24 horas entre si e os de 7 dias com relação à média de peso corporal no dia da hepatectomia, nenhum teve diferença estatística. Entretanto, quando comparamos, entre os grupos, as médias dos pesos corporais no segundo e no quarto dias de pós-operatório, e também na morte, observamos diferenças estatisticamente significativas nesses três períodos ( $p=0,03$ ,  $p=0,01$  e  $p=0,02$  respectivamente), sugerindo a interferência da droga imunossupressora no peso dos animais no decorrer do estudo.

Tannuri *et al.* (2008c) estudaram 36 ratos recém-nascidos com pesos entre 30 e 50 gramas e os dividiram em 6 grupos: controle, *sham*, hepatectomia 70%, hepatectomia com administração de solumedrol, hepatectomia com ciclosporina e hepatectomia com tacrolimus. Nesse estudo, a ciclosporina promoveu queda significativa no peso hepático no dia da morte dos ratos em comparação com o grupo da hepatectomia ( $p = 0,01$ ). Já Ibirogbá *et al.* (2005) compararam ratos *Long Evans* hepatectomizados a 70% com um grupo *sham* ambos tratados com citosol



hepático e ciclosporina. A relação peso hepático / peso corporal não se alterou com a administração do citosol ou da ciclosporina.

Em nosso estudo, com relação ao peso hepático, avaliamos e comparamos, entre os 4 grupos, as aferições das médias do peso do fígado ressecado (70% da massa total), do peso da massa restante e do peso total do órgão no momento da hepatectomia e da morte. Além disso, as médias da relação do peso total do fígado na data da ressecção hepática e também no momento da morte do animal com seu peso corporal foram avaliados. Não observamos em nenhuma dessas análises qualquer diferença estatisticamente significativa, evidenciando dessa maneira a igualdade entre os grupos.

Quanto à avaliação da regeneração hepática, utilizou-se a fórmula de Kwon (KWON, 1990) para cálculo da porcentagem da regeneração no momento da morte dos animais, a avaliação do índice mitótico pela coloração de hematoxilina e eosina, além da análise imunoistoquímica dos espécimes cirúrgicos com os marcadores Ki-67 e PCNA (KELMAN, 1997; SAWHNEY, 1992; ASSY, 1998).

A fórmula descrita por Kwon (1990) avalia a porcentagem da regeneração hepática em cada grupo, ou seja, quanto o fígado regenerou em 24 horas e em 7 dias de acordo com o momento em que os animais foram mortos. Em 2006, Biondo-Simões *et al.* (2006) compararam ratos jovens de 90 dias e adultos com 560 dias submetidos à hepatectomia parcial 70%. Esses animais foram mortos ao exemplo de nosso estudo com 24 horas e 7 dias de pós-operatório e analisada a sua regeneração hepática de acordo com a fórmula de Kwon, índice mitótico e imunoistoquímica com PCNA. De acordo com a fórmula de Kwon, os animais jovens regeneraram mais em 24 horas e 7 dias que os adultos; porém em 7 dias os animais adultos alcançaram o mesmo volume hepático que os jovens haviam alcançado em 24 horas. Esses mesmos autores estudaram a regeneração hepática em ratos em 2007 comparando ratos normais e hipotireoideos. Os últimos apresentaram menor porcentagem de regeneração hepática em 24 horas, porém em 7 dias não houve diferença estatística entre os grupos de acordo com a fórmula de Kwon.

No presente trabalho, quando comparamos os valores de regeneração pela fórmula de Kwon dentro de cada grupo, observamos aumento significativo da taxa de regeneração no grupo controle ao longo do tempo (60,72% em 24 h X 83,61% em 7 dias,  $p=0,0001$ ). O mesmo tipo de resultado foi obtido no grupo de estudo que usou ciclosporina (62,93% em 24 h X 93,05% em 7 dias,  $p=0,0001$ ). Isso deve-se ao

fato que o ciclo celular dos hepatócitos tem seu pico em 24 horas (FAUSTO, 2005) e o das células não parenquimatosas segue 24 horas após o dos hepatócitos (LABRECQUE, 1994). Nas ressecções maiores que 50%, como em nosso estudo, observa-se ainda um segundo pico de mitoses, que nos ratos ocorre cerca de 3 dias após o primeiro (KONIARIS, 2003). Entretanto, quando comparados os grupos de maneira intergrupo, ou seja, C.24h X E.24h e C.7d X E.7d, apenas nos grupos de 7 dias é que houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ), com média de regeneração maior no grupo da ciclosporina.

A ação dos imunossupressores, em especial a ciclosporina, na regeneração hepática vem sendo abordada por alguns autores tanto em relação ao transplante hepático quanto nas ressecções segmentares deste órgão. Alvira *et al.* (2002) evidenciaram que os efeitos hepatotóxicos e hepatotróficos da ciclosporina em porcos transplantados são dose-dependentes. Esses autores não observaram diferenças estatísticas tanto no volume do enxerto quanto na regeneração hepática nos grupos com e sem ciclosporina. Dahmen *et al.* (2002) evidenciaram que os inibidores de calcineurina (CSA 5mg/Kg/dia e FK 506 1mg/Kg/dia) aumentaram a regeneração hepática após hepatectomia e enxertos de *split liver*. Esses mesmos autores compararam o efeito de quatro drogas imunossupressoras na regeneração hepática após hepatectomia pelo modelo de Higgins e Anderson e comprovaram o efeito hepatotrófico dos inibidores de calcineurina, assim como aumento na sobrevida dos animais, ao contrário das drogas antiproliferativas (MMF e Sirolimus) que inibiram a regeneração (DAHMEN, 2002).

Kim *et al.* (1988a) possuem a maior série de publicações com relação à pré-terapia com ciclosporina e posterior análise da regeneração após hepatectomia 70% e também 90%. Várias dosagens de ciclosporina foram utilizadas com aumento de duas vezes o pico de mitoses com as dosagens de 5 e 10mg/Kg/dia.

Recentemente, Nagayoshi *et al.* (2008) relataram os efeitos dose-dependentes da ciclosporina na regeneração hepática em ratos submetidos à hepatectomia 70% e mortos com 24 horas, 3, 7 e 14 dias após o procedimento cirúrgico. O grupo controle e o de estudo com 5mg/Kg/dia de ciclosporina não alteraram significativamente a regeneração hepática, ao contrário do grupo submetido à dosagem de 10mg/Kg/dia de ciclosporina.

A regeneração hepática também foi avaliada pelo índice mitótico e análise imunoistoquímica com os marcadores PCNA e Ki-67. O índice mitótico avalia o

número de hepatócitos em processo de mitose corados no HE em aumento de 400 vezes. Estudos evidenciaram aumento nos índices mitóticos em ratos hepatectomizados e submetidos à administração de ciclosporina via oral 24 horas antes, imediatamente após e 24 e 48 horas após a ressecção hepática (KIM, 1988b). Nesse mesmo estudo, grupos com hepatectomia isolada (controle), hepatectomia com administração de azatioprina e hepatectomia com administração de metilprednisolona nos mesmos períodos foram avaliados. No grupo controle o índice mitótico foi máximo com 24 horas e nos dois grupos com azatioprina e corticóide houve supressão significativa dos mesmos entre 24 e 30 horas após a hepatectomia. Já em nosso estudo, a análise estatística do índice mitótico foi significativa apenas quando comparados os grupos controles entre si e os de estudo com maior número de figuras de mitose no subgrupo de 7 dias ( $p=0,006$  e  $p = 0,007$  respectivamente). Quando comparados os grupos de maneira intergrupo, não houve diferença estatística. Isso deve-se ao fato de termos trabalhado com ratos adultos, evitando desse modo ratos jovens e idosos, com crescimento e capacidade regenerativa diferente em cada fase da vida. Alguns estudos evidenciaram que idade mais avançada está relacionada, em ratos, com atraso da regeneração hepática, visto que os ratos jovens em 24 horas após a hepatectomia apresentaram mais figuras de mitose que os adultos, fato que não ocorreu aos 7 dias pós-ressecção hepática (BIONDO-SIMÕES, 2006). Nossos resultados vêm de encontro com os de Baratta *et al.* (1996). Eles detectaram pelo menos dois picos de proliferação celular. O primeiro inicia-se na fase S cerca de 18 horas após a hepatectomia e termina em torno de 26 horas após a ressecção. Já a outra começa na fase S por volta de 26 horas e acabam 34 horas após o procedimento cirúrgico. A primeira pode ser detectada na periferia do lóbulo e a segunda pode ser vista tanto nas áreas periféricas quanto nas centrais.

Existem vários métodos de quantificação da regeneração hepática como por exemplo: análise da massa hepática, contagem de figuras de mitose, identificação da síntese de DNA (aferição da incorporação da Timidina-H3, citometria de fluxo, incorporação da bromodeoxydeuridina) e métodos imunoistoquímicos como baseados no uso de anticorpos de moléculas teciduais endógenas como o antígeno nuclear de proliferação celular, alfa DNA polimerase, Ki-67, Anti-PAA, redutase anti-ribonucleotídeo, C5F10 ou proteína transformadora relacionada ao P53. De todos, o mais comumente utilizado é o PCNA. É uma proteína auxiliadora da DNA polimerase

delta, essencial para a replicação do DNA. Sua expressão é dependente do ciclo celular. Detectado inicialmente na fase final de G<sub>1</sub> e com máxima detecção na fase S, expressando a transição entre essas fases (BIONDO-SIMÕES, 2006). Assy *et al.* (1998) estudaram o uso do PCNA como marcador da regeneração hepática em ratos submetidos à hepatectomia 30% e 70%, além de comparação com grupo controle (*sham*). Após 12 horas, pequeno pico de PCNA foi aparente, porém sem diferença estatística até 24 horas após a hepatectomia. Pico de PCNA ocorreu das 36 até as 48 horas ( $p < 0,01$ ) e os níveis permaneceram acima da média até 72 horas após a ressecção hepática ( $p < 0,05$ ). Em nosso estudo, cruzamos os dados intra e intergrupos utilizando o PCNA. Diferença estatística significativa foi encontrada apenas quando comparamos os grupos de estudo E.24h e E.7d ( $p=0,0001$ ), com menor número de núcleos positivos no de 7 dias. Isto deve-se ao fato de que o segundo pico de proliferação dos hepatócitos ocorre após as primeiras 24 horas da ressecção hepática, por volta de 26 horas terminando cerca de 34 horas após a hepatectomia. Com isso, ao final dos 7 dias, os núcleos já não estão mais com a cromatina organizada dentro de uma carioteca íntegra e o produto que é detectado pela imunoistoquímica se dispersa no citoplasma impossibilitando a positividade dos mesmos. Com isso, em ratos adultos e idosos, o fígado necessita de mais tempo para recuperar o seu volume (BIONDO-SIMÕES, 2006). Diferenças estatísticas não foram observadas quando comparados os dois grupos de 7 dias ( $p = 0,09$ ).

O Ki-67 é um antígeno nuclear expresso nas fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M do ciclo celular. Já está presente em células que entram em G<sub>1</sub>, aumenta durante o ciclo e declina rapidamente após a mitose. A proteína Ki-67 está localizada no núcleo celular, predominantemente no nucléolo. Está intimamente associada com proliferação celular e durante a dissociação nucleolar da mitose, encontra-se na periferia dos cromossomos (BROWN, 2002). O índice do Ki-67 (percentual de células marcadas / total de células avaliadas) tem sido utilizado para quantificar a atividade proliferativa de determinado tumor ou tecido, no caso, fígado em regeneração. Em nossa pesquisa, semelhante ao PCNA, apenas houve diferença estatisticamente significativa ao comparar os grupos da ciclosporina de 24 horas e 7 dias ( $p=0,04$ ), confirmando o segundo pico de proliferação dos hepatócitos e a necessidade de mais tempo para o fígado recuperar seu volume em ratos adultos e idosos. Não houve diferença significativa ao se comparar os dois grupos de 7 dias ( $p = 0,70$ ).

Por conseguinte, os efeitos da pré-terapia com ciclosporina na regeneração hepática, de forma geral, permanecem indefinidos, com alguns estudos a favor e outros contrários à estimulação da proliferação hepatocitária. Os dados do presente estudo sugerem efeito estimulatório da ciclosporina na regeneração do fígado no decorrer dos 7 dias até o momento da morte dos ratos, apesar de provocar diminuição do peso dos animais. Embora valores pouco significativos tenham sido encontrados com relação à histologia comum e à imunoistoquímica, outros estudos devem ser realizados a fim de se comprovar os reais efeitos na regeneração hepática. Perspectivas futuras apontam para possível aplicação clínica de drogas imunossupressoras como os inibidores da calcineurina em transplantes intervivos, incluindo os doadores e, *split-livers* a fim de estimular a regeneração hepática e restabelecer o volume e função normal do órgão após uma ressecção ou transplante.

## 6 CONCLUSÕES

- Foi possível determinar, utilizando o peso corporal, pesos da massa hepática ressecada e do fígado regenerado, a porcentagem de regeneração hepática 24 horas e 7 dias após a hepatectomia 70%, ficando “sugerido” o efeito favorável da ciclosporina sobre o modelo de regeneração hepática utilizado neste estudo;
- Foi possível determinar o índice mitótico observado em histologia convencional com hematoxilina e eosina 24 horas e 7 dias após a hepatectomia 70%, demonstrando elevação significativa do índice mitótico em ambos os grupos entre os momentos 24 horas e 7 dias, porém, quando realizada análise intergrupos, a ciclosporina não mostrou efeito favorável à regeneração hepática;
- Foi possível comprovar proliferação hepatocitária pelos métodos imunoistoquímicos utilizados, porém sem efeito benéfico demonstrado pela ciclosporina;
- Após correlação comparativa dos resultados, concluímos que a ciclosporina possui papel estimulador, em 1 dos quatro parâmetros de avaliação da regeneração hepática estudados, do fenômeno de regeneração hepática desencadeado pela hepatectomia 70% em ratos *Wistar* plenamente desenvolvidos.

## REFERÊNCIAS

- ADDREIS, P. G.; WHITFIELD, D. J. E.; ARMATO, U. Stimulation of DNA synthesis and mitosis of hepatocytes in primary cultures of neonatal rat liver by arachidonic acid and prostaglandins. **Exp. Cell. Res.**, New York, v. 134, p. 265-272, 1981.
- ALBRECHT, J. H.; HANSEN, L. K. Cyclin D1 promotes mitogen-independent cell cycle progression in hepatocytes. **Cell Growth Differ.**, Baltimore, v. 10, p. 397-404, 1999.
- ALEXANDER, W. S.; HILTON, D. J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. **An. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 22, p. 503-529, 2004.
- ALOIA, T. P. A. **Efeitos de fatores hepatotróficos no fígado em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*)**. 108 f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- ALVIRA, L. G.; HERRERA, N.; SALAS, C.; PEREIRA, F.; HERRERA, J.; SUAREZ-MASSA, M. D.; CASTILLO-OLIVARES, J. L. Influence of cyclosporine on graft regeneration and function after liver transplantation: trial in pigs. **Transpl. Proc.**, New York, v. 34, p. 315-316, 2002.
- ANKOMA-SEY, V. Hepatic regeneration-revisiting the myth of Prometheus. **News Physiol Sci.**, Baltimore, v. 14, p. 149-155, 1999.
- ARGAST, G.; CAMPBELL, J. S.; BROOLING, J. T.; FAUSTO, N. Epidermal growth factor receptor transactivation mediates tumor necrosis factor-induced hepatocyte replication. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 279, p. 34530-34536, 2004.
- ASSY, N.; MINUK, G. Y. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. **J. Hepatology**, Amsterdam, v. 26, n. 4, p. 945-952, 1997.
- ASSY, N.; GONG, Y.; ZHANG, M.; PETTIGREW, N. M.; PASHNIAK, D.; MINUK, G. Y. Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **J. Lab. Clin. Med.**, St. Louis, v. 131, n. 3, p. 251-256, 1998.
- BAKER, A. L. Hepatotrophic factors: basic concepts and clinical implications. **Acta Med. Scand. Suppl.**, Stockholm, v. 703, p. 201, 1985.
- BARATTA, B.; RIZZOLI, R.; GALLIANI, I.; VITALE, M.; RIZZI, E.; MATTEUCCI, A.; GALANZI, A.; ZAMAI, L.; MAZZOTTI, G. Early events of liver regeneration in rats: a multiparametric analysis. **Histochem. Cell Biol.**, Berlin, v. 105, n. 1, p. 61-69, 1996.
- BEYER, H. S. Lack of effect of hypothyroidism on rat liver regeneration. **Biochem. Int.**, Sydney, v. 27, p. 497-500, 1992.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; MATIAS, J. E. F.; MONTIBELLER, G. R.; SIQUEIRA, L. C. D.; NUNES, E. S.; GRASSI, C. A. Effect of aging on liver regeneration in rats. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 197-201, 2006.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; CASTRO, G. R. C.; MONTIBELLER, G. R.; SADOWSKI, J. A.; BIONDO-SIMÕES, R. The influence of hypothyroidism on liver regeneration: an experimental study in rats. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 22, p. 52-56, 2007.

BOROWIAK, M.; GARRATT, A. N.; WUSTEFELD, T.; STREHLE, M.; TRAUTWEIN, C.; BIRCHMEIER, C. Met provides essential signals for liver regeneration. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, Washington, v. 101, p. 10608-10613, 2004.

BRAUN, L.; MEAD, J. E.; PANZICA, M.; MIKUMO, R.; BELL, G. I.; FAUSTO, N. Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 85, p. 1539-1543, 1988.

BRENNER, D. A.; KOCH, K. S.; LEFFERT, H. L. Transforming growth factor- $\alpha$  stimulates proto-oncogene c-jun expression and a mitogenic program in primary cultures of adult rat hepatocytes. **DNA Cell Biol.**, New York, v. 8, p. 279-285, 1989.

BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Ki-67 protein: the immaculate deception? **Histopathology**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 2-11, 2002.

BUCHER, N. L. Liver regeneration: an overview. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, Melbourne, v. 6, p. 615-624, 1991.

CALNE, R. Y. *et al.* Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, 2 livers. **Lancet**, London, v. 2, p. 1033-1036, 1979.

CALNE, R. Y. Cyclosporine and liver transplantation. **Mt. Sinai J. Med.**, New York, v. 54, p. 465, 1987.

CAMPBELL, J. S.; PRICHARD, L.; SCHAPER, F.; SCHMITZ, J.; STEPHENSON-FAMY, A.; ROSENFELD, M.; ARGAST, G. M.; HEINRICH, P. C.; FAUSTO, N. Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 107, p. 1285-1292, 2001.

CANALESE, J.; GOVE, C. D.; GIMSON, A. E.; WILKINSON, S. P.; WARDLE, E. N.; WILLIAMS, R. Reticuloendothelial system and hepatocytic function in fulminant hepatic failure. **Gut**, London, v. 23, p. 265-269, 1982.

CATALDEGIRMEN, G.; ZENG, S.; FEIRT, N.; IPPAGUNTA, N.; DUN, H.; QU, W.; LU, Y.; RONG, L. L.; HOFMANN, M. A.; KISLINGER, T.; PACHYDAKI, S. I.; JENKINS, D. G.; WEINBERG, A.; LEFKOWITCH, J.; ROGIERS, X.; YAN, S. F.; SCHMIDT, A. M.; EMOND, J. C. RAGE limits regeneration after massive liver injury by coordinated suppression of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B. **J. Exp. Med.**, New York, v. 201, p. 473-484, 2005.



COLUMBANO, A.; SHINOZUKA, H. Liver regeneration versus direct hyperplasia. **FASEB J.**, Bethesda, v. 10, p. 1118-1128, 1996.

COUGHLIN, J. P.; AUSTEN JR, W. G.; DONAHOE, P. K.; RUSSELL, W. E. Liver regeneration during immunosuppression. **J. Pediatr. Surg.**, New York, v. 22, p. 566-570, 1987.

COURT, F. G.; WEMYSS-HOLDEN, S. A.; DENNISON, A. R.; MADDERN, G. J. The mystery of liver regeneration. **Brit. J. Surg.**, Guildford, v. 89, p. 1089-1095, 2002.

CRESSMAN, D. E.; DIAMOND, R. H.; TAUB, R. Rapid activation of the STAT3 transcription complex in liver regeneration. **Hepatology**, Baltimore, v. 21, p. 1443-1449, 1995.

CRUISE, J. L.; COTECCHIA, S.; MICHALOPOULOS, G. K. Norepinephrine decreases EGF binding in primary rat hepatocyte cultures. **J. Cell. Physiol.**, Philadelphia, v. 127, p. 39-44, 1986.

DAHMEN, U.; GU, Y. L.; SHEN, K.; DIRSCH, O.; LI, J.; FAN, L. M.; BROELSCH, C. E. Onset of liver regeneration after subtotal resection is inhibited by the use of new immunosuppressive drugs. **Transpl. Proc.**, New York, v. 34, p. 2312-2313, 2002.

DAOUDAKI, M.; FOUZAS, I.; STAPF, V.; EKMEKCIOGLU, C.; IMVRIOS, G.; ANDONIADIS, A.; DEMETRIADOU, A.; THALHAMMER, T. Cyclosporine A augments P-glycoprotein expression in the regenerating rat liver. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 26, n. 3, p. 303-307, 2003.

DIEHL, A. M.; RAI, R. Review: regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, Melbourne, v. 11, p. 466-470, 1996.

DUNN, C. J. *et al.* Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of an microemulsion-based formulation (neoral) 1 in organ transplantation. **Drugs**, New York, v. 61, p. 1957, 2001.

EMOND, J.; CAPRON-LAUDEREAU, M.; MERIGGI, F.; BERNUAU, J.; REYNES, M.; HOUSSIN, D. Extent of hepatectomy in the rat: evaluation of basal conditions and effect of therapy. **Eur. Surg. Res.**, Basel, v. 21, p. 251-259, 1989.

FABRIKANT, J. I. The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. **J. Cell Biol.**, New York, v. 36, p. 551-565, 1968.

FARBER, J. L.; EL-MOFTY, S. K. The biochemical pathology of liver cell necrosis. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 81, p. 237-250, 1975.

FAUSTO, N.; MEAD, J. E.; BRAUN, L.; THOMPSON, N. L.; PANZICA, M.; GOYETTE, M.; BELL, G. I.; SHANK, P. R. Proto-oncogene expression and growth factor during liver regeneration. **Symp. Fundament. Cancer Res.**, Baltimore, v. 39, p. 69-86, 1987.

FAUSTO, N.; MEAD, J. E. Regulation of liver growth: protooncogenes and transforming growth factors. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 60, p. 4-13, 1989.

FAUSTO, N. Hepatic regeneration. In: ZAKIM, D.; BOYER, T. D., EDS. **Hepatology: a textbook of liver disease**. 2<sup>nd</sup> ed., Philadelphia: WB Saunders, 1990. v.1, p. 49-65.

FAUSTO, N. Growth factors in liver development, regeneration and carcinogenesis. **Prog. Growth Factor Res.**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 219-234, 1991.

FAUSTO, N.; WEBBER, E. M. Liver regeneration. In: ARIAS, J.; BOYER, J.; FAUSTO, N. *et al.* **The liver: biology and pathobiology**. New York; Raven Press, 1994. p.1059-1084.

FAUSTO, N.; LAIRD, A. D.; WEBBER, E. M. Liver regeneration 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. **FASEB J.**, Bethesda, v. 9, n. 15, p. 1527-1536, 1995.

FAUSTO, N. Liver regeneration. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v. 32, s. 1, p. 19-31, 2000.

FAUSTO, N.; CAMPBELL, J. S. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. **Mech. Dev.**, Limerick, v. 120, p. 117-130, 2003.

FAUSTO, N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells and stem cells. **Hepatology**, Baltimore, v. 39, p. 1477-1487, 2004.

FAUSTO, N.; RIEHLE, K. J. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. **J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.**, Tokyo, v. 12, p. 181-189, 2005.

FITZGERALD, M.; WEBBER, E.; DONOVAN, J.; FAUSTO, N. Rapid DNA binding by nuclear factor KB in hepatocytes at the start of liver regeneration. **Cell Growth Diff.**, Baltimore, v. 6, p. 417-427, 1995.

FLEIG, W. E.; HOSS, G. Partial purification of rat hepatic stimulator substance and characterization of its action on hepatoma cells and normal hepatocytes. **Hepatology**, Baltimore, v. 9, p. 240-248, 1989.

FRANCAVILLA, A. *et al.* The effect of estrogen and tamoxifen on hepatocyte proliferation in vivo and in vitro. **Hepatology**, Baltimore, v. 9, p. 614-620, 1989a.

FRANCAVILLA, A. *et al.* Estradiol and testosterone levels in patients undergoing partial hepatectomy. A possible signal for hepatic regeneration? **Dig. Dis. Sci.**, New York, v. 34, p. 818-822, 1989b.

FRANCAVILLA, A.; BARONE, M.; STARZL, T. E.; ZEEVI, A.; SCOTTI, C.; CARRIERI, G.; MAZZAFERRO, V.; PRELICH, J.; TODO, S.; EIRAS, G.; FUNG, J.; PORTER, K. A. FK 506 as a growth control factor. **Transplant. Proc.**, New York, v. 23, p. 90-92, 1990a.

FRANCAVILLA, A.; PANELLA, C.; POLIMENO, L.; GIANGASPERO, A.; MAZZAFERRO, V.; PAN, C. E.; VAN THIEL, D. H.; STARZL, T. E. Hormonal and

enzymatic parameters of hepatic regeneration in patients undergoing major liver resections. **Hepatology**, Baltimore, v. 12, p. 1134-1138, 1990b.

FRANCAVILLA, A.; STARZL, T. E.; BARONE, M.; ZENG, Q.; PORTER, K. A.; ZEEVI, A.; MARKUS, P. M.; VAN DEN BRINK, M. R. M.; TODO, S. Studies on mechanisms of augmentation of liver regeneration by cyclosporine and FK 506. **Hepatology**, Baltimore, v. 14, p. 140-143, 1991a.

FRANCAVILLA, A.; STARZL, T. E.; CARR, B.; AZZARONE, A.; CARRIERI, G.; ZENG, Q.; PORTER, K. A. The effects of FK 506, cyclosporine and rapamycin on liver growth in vitro and in vivo. **Transplant. Proc.**, New York, v. 23, p. 2817-2820, 1991b.

FRANCAVILLA, A. *et al.* Hepatocyte proliferation and gene expression induced by triiodothyronine in vivo and in vitro. **Hepatology**, Baltimore, v. 20, p. 1237-1241, 1994.

FUJITA, M.; FURUKAWA, H.; HATTORI, M.; TODO, S.; ISHIDA, Y.; NAGASHIMA, K. Sequential observation of liver cell regeneration after massive hepatic necrosis in auxiliary partial orthotopic liver transplantation. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v. 13, p. 152-157, 2000.

GAUB, J.; IVERSEN, J. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. **Hepatology**, Baltimore, v. 4, p. 902-904, 1984.

GORDON, R. D. *et al.* Indications for liver transplantation in the cyclosporine era. **Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 66, p. 541, 1986.

GOVE, C. D.; HUGHES, R. D. Liver regeneration in relationship to acute liver failure. **Gut**, London, suppl., p.S92-S96, 1991.

GRISHAM, J. W. A morphologic study of deoxuribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver: autoradiography with thymidine-H. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 22, p. 842-849, 1962.

GROOSSENS, V.; GROOTEN, J.; DE VOS, K.; FIERS, W. Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 92, p. 8115-8119, 1995.

GUPTA, S. Hepatic growth factors: progress and perspectives. In: GITNICK, G. **Current hepatology**, Chicago: Year Book Medical Publishers, 1992. v.12, p. 75-130.

HAGA, S.; TERUI, K.; ZHANG, H. Q. STAT3 protect against Fas-induced liver injury by redox-dependent and independent mechanisms. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 112, p. 989-998, 2003.

HENRY, M. L. Cyclosporine and tacrolimus (FK 506): a comparison of efficacy and safety profiles. **Clin. Transplant.**, Copenhagen, v. 13, p. 209, 1999.

HIGGINS, G. M.; ANDERSON, R. M. Experimental pathology of the liver; I. Restoration of the liver by the white rat following partial surgical removal. **Arch. Pathol.**, Chicago, v. 12, p. 186-202, 1931.

HILLIER, S. G.; MIRO, F. Inhibin, activin, and follistatin. **Ann. NY Acad. Sci.**, New York, v. 687, p. 29-38, 1993.

HOLT, D. R.; THIEL, D. V.; EDELSTEIN, S.; BREMS, J. J. Hepatic resections. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 135, p. 1353-1358, 2000.

HOUCK, K. A.; MICHALOPOULOS, G. K. Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor- $\beta$ . **J. Cell Physiol.**, Philadelphia, v. 141, p. 503-509, 1989.

HUANG, R.; SCHIANO, T. D.; AMOLAT, M. J.; MILLER, C. M.; THUNG, S. N.; SAXENA, R. Hepatocellular proliferation and changes in microarchitecture of right-lobe allografts in adult transplant recipients. **Liver Transpl.**, Philadelphia, v. 10, p. 1461-1467, 2004.

IBDAH, J. A.; YANG, Z.; BENNETT, M. J. Liver disease in pregnancy and fetal fatty acid oxidation defects. **Mol. Genet. Metab.**, Orlando, v. 71, p. 182-189, 2000.

IBIROGBA, S. B.; SPEARMAN, C. W.; MALL, A.; SHEPHERD, E.; LOTZ, Z.; TYLER, M.; KAHN, D. Restoration of liver mass after partial hepatectomy – implications for living donor liver transplantation. **S. Afr. J. Surg.**, Johannesburg, v. 43, n. 3, p. 70-72, 2005.

JORGENSEN, K. A.; KOEFOED-NIELSEN, P. B.; KARAMPERIS, N. Calcineurin phosphatase activity and immunosuppression. A review on the role of calcineurin phosphatase activity and the immunosuppressive effect of cyclosporin A and tacrolimus. **Scand. J. Immunol.**, Oslo, v. 57, p. 93, 2003.

KAHN, D.; MAKOWKA, L.; LAI, H.; EAGON, P. K.; DINDZANS, V.; STARZL, T. E.; VAN THIEL, D. H. Cyclosporine augments hepatic regenerative response in rats. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v. 35, p. 392-398, 1990.

KAM, I. *et al.* Evidence that host size determines liver size: studies in dogs receiving orthotopic liver transplants. **Hepatology**, Baltimore, v. 7, p. 362-366, 1987.

KAM, M.; HUAN, J.; MANSSON, P.; YASUMITSO, H.; CARR, B.; MCKEEHAN, W. Heparin-binding growth factor type 1 (acidic fibroblast growth factor); a potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 86, p. 7432-7436, 1989.

KAPLOVITZ, N. Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. **Semin. Liver Dis.**, New York, v. 22, p. 137-144, 2002.

KELMAN, Z. PCNA structure, functions and interactions. **Oncogene**, Basingstone, v. 14, p. 629-640, 1997.

KIKUCHI, N.; YAMAGUCHI, Y.; MORI, K.; TAKATA, N.; GOTO, M.; MAKIMO, Y.; HAMAGUCHI, H.; HISAMA, N.; OGAWA, M. Effect of cyclosporine on liver regeneration after orthotopic reduced-size hepatic transplantation in the rat. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v. 38, p. 1492-1499, 1993.

KIKUCHI, N.; YAMAGUCHI, Y.; MORI, K.; TAKATA, N.; GOTO, M.; MAKIMO, Y.; HAMAGUCHI, H.; HISAMA, N.; OGAWA, M. Liver regeneration after orthotopic reduced-size hepatic transplantation in the rat. **Hepatogastroenterology**, Stuttgart, v. 41, p. 170-173, 1994.

KIM, Y. I.; CALNE, R. Y.; NAGASUE, N. Cyclosporine A stimulates proliferation the liver cells after partial hepatectomy in rats. **Surg. Gynecol. Obstet.**, St. Louis, v. 166, p. 317-322, 1988a.

KIM, Y. I.; SALVINI, P.; AUXILIA, F.; CALNE, R. Y. Effect of cyclosporine A on hepatocyte proliferation after partial hepatectomy in rats: comparison with standard immunosuppressive agents. **Am. J. Surg.**, New York, v. 155, p. 245-249, 1988b.

KIM, Y. I.; NAKASHIMA, K.; KAWANO, K.; KOBAYASHI, M. Evidence that cyclosporine is hepatotoxic and hepatotrophic in 70% hepatectomized rats and mice. **Eur. Surg. Res.**, Basel, v. 22, p. 231-237, 1990.

KIM, Y. I.; KAWANO, K.; IWAO, Y.; SHIMADA, T.; KOBAYASHI, M. Influences of cyclosporine pretherapy on 90% hepatectomizes rats. **Eur. Surg. Res.**, Basel, v. 24, p. 226-233, 1992.

KIM, Y. I.; KOBAYASHI, M.; EGASHIRA, T.; KAWANO, K.; MORIMOTO, A.; KAI, T.; SHIMADA, T. Augmentation of hepatocyte proliferation by immunosuppressant pretherapy is associated with up-regulation of malondialdehyde production. **Res. Exp. Med.**, Berlin, v. 193, n. 5, p. 337-345, 1993.

KITAMURA, T.; WATANABE, S.; SATO, N. Liver regeneration, liver cancers and cyclins. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, Melbourne, v. 13, suppl, p.S96-S99, 1998.

KOGURE, K. *et al.* Intravenous administration of follistatin: delivery to the liver and effect on liver regeneration after partial hepatectomy. **Hepatology**, Baltimore, v. 24, p. 361-366, 1996.

KONIARIS, L. G.; MCKILLOP, I.; SCHWARTZ, S. I.; ZIMMERS, T. A. Liver regeneration. **J. Am. Coll. Surg.**, Chicago, v. 197, n. 4, p. 634-659, 2003.

KOUNTOUAS, J.; BOURA, P.; LYGIDAKIS, N. J. Liver regeneration after hepatectomy. **Hepatogastroenterology**, Stuttgart, v. 48, p. 556-562, 2001.

KRAHENBUHL, L.; FEODOROVICI, M.; RENZULLI, P.; SCHAFFER, M.; ABOU-SHADY, M.; BAER, H. U. Laparoscopic partial hepatectomy in the rat: a new resectional technique. **Dig. Surg.**, New York, v. 15, p. 140-144, 1998.

KREBS, D. L.; HILTON, D. J. SOCS: Physiological suppressors of cytokine signaling. **J. Cell Sci.**, London, v. 1113, p. 2813-2819, 2000.

KUBOTA, M.; TAKABE, K.; YANG, M. Minimum sizes for remnant and transplanted livers in rats. **J. Hepatobiliary Pancreat Surg.**, Tokyo, v. 4, p. 398-403, 1997.

KUEBLER, J. F. *et al.* Dehydroepiandrosterone restores hepatocellular function and prevents liver damage in estrogen-deficient females following trauma and hemorrhage. **J. Surg. Res.**, New York, v. 97, p. 196-201, 2001.

KUEBLER, J. F. *et al.* Estradiol administration improves esplanchnic perfusion following trauma-hemorrhage and sepsis. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 137, p. 74-79, 2002.

KWON, A. H.; UETSUJI, S.; YAMAMURA, M.; HIOKI, K.; YAMAMOTO, M. Effect of administration of fibronectin or aprotinin on liver regeneration after experimental hepatectomy. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 211, n. 3, p. 295-300, 1990.

LABRECQUE, D. R. Preparation and partial characterization of regenerative stimulator substance (SS) from rat liver. **J. Physiol.**, London, v. 248, p. 273-284, 1975.

LABRECQUE, D. R. In vitro stimulation of cell growth by hepatic stimulator substance. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 242, p. 289-295, 1982.

LABRECQUE, D. R.; BACHUR, N. R. Hepatic stimulator substance: physicochemical characteristics and specificity. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 242, p. 281-288, 1982.

LABRECQUE, D. R.; WILSON, M.; FOGERTY, S. Stimulation of HTC hepatoma cell growth in vitro by hepatic stimulator substance (HSS). Interactions with serum, insulin, glucagon, epidermal growth factor and platelet derived growth factor. **Exp. Cell. Res.**, New York, v. 160, p. 419-429, 1984.

LABRECQUE, D. R. Hepatic stimulator substance: discovery characteristics and mechanism of action. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v. 36, p. 669-673, 1991.

LABRECQUE, D. Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle. **J. Gastroenterol.**, v. 89, n. 8, p. 586-596, 1994.

LEE, D. C.; SUNNARBORG, S. W.; HINKLE, C. L.; MYERS, T. J.; STEVENSON, M. Y.; RUSSELL, W. E.; CASTNER, B. J.; GERHART, M. J.; PAXTON, R. J.; BLACK, R. A.; CHANG, A.; JACKSON, L. F. TACS / ADAM 17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase. **Ann. NY Acad. Sci.**, New York, v. 995, p. 22-38, 2003.

LEEVY, C. B. Abnormalities of liver regeneration: a review. **Dig Dis.**, Basel, v. 16, p. 88-98, 1998.

LEFFERT, H. L.; KOCH, K. S.; LAD, P. J.; SHAPIRO, L. P.; SKELLY, H.; HEMPTINNE, B. Hepatocyte regeneration, replication and differentiation. In: ARIAS, I. L.; JAKOBY, W. B.; POPPER, H.; CHACTER, D.; SHAFRITZ, D. A. **The liver: biology and pathobiology**. 2<sup>nd</sup>. New York: Raven Press, 1988. p. 833-850.

LIBBRECHT, L.; ROSKAMS, T. Hepatic progenitor cells in human liver disease. **Semin. Cell Dev. Biol.**, London, v. 13, p. 389-396, 2002.

MACMANUS, J. P.; BRACELAND, B. M. A connection between the production of prostaglandins during liver regeneration and the DNA synthesis response. **Prostaglandins**, Los Altos, v. 11, p. 609-620, 1976.

MADRAHIMOV, N.; DIRSCH, O.; BROELSCH, C.; DAHMEN, U. Marginal Hepatectomy in the rat. From anatomy to surgery. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 244, n. 1, p. 89-98, 2006.

MARCOS, A.; FISCHER, R. A.; HAM, J. M.; SHIFFMAN, M. L.; SANYAL, A. J.; LUKETIC, V. A.; STERLING, R. K.; FULCHER, A. S.; POSNER, M. P. Liver regeneration and function in donor and recipient after right lobe adult to adult living donor liver transplantation. **Transplantation**, Baltimore, v. 69, p. 1375-1379, 2000.

MARTINS, P. N. A.; THERUVATH, T. P.; NEUHAUS, P. Rodent models of partial hepatectomies. **Liver Int.**, Oxford, p. 3-9, 2007.

MAZZAFERRO, V.; PORTER, K. A.; SCOTTI-FOGLIENI, C. L.; VENKATARAMANAN, R.; MAKOWKA, L.; ROSSARO, L.; FRANCAVILLA, A.; TODO, S.; VAN THIEL, D. H.; STARZL, T. E. The hepatotrophic influence of cyclosporine. **Surgery**, St. Louis, v. 107, p. 533-539, 1990.

MCGOWAN, J. A.; STRAIN, A. J.; BUCHER, N. L. R. DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic-AMP. **J. Cell. Physiol.**, Philadelphia, v. 180, p. 353-363, 1981.

MEAD, J. E.; FAUSTO, N. Transforming growth factor TGF $\alpha$  may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 86, p. 1558-1562, 1989.

MICHALOPOULOS, G. K.; HOUCK, K. A.; DOLAN, M. L.; LUETTEKE, N. C. Control of hepatocyte replication by two serum factors. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 44, p. 4414-4419, 1984.

MICHALOPOULOS, G. K. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. **FASEB J.**, Bethesda, v. 4, p. 176-187, 1990.

MICHALOPOULOS, G. K.; ZARNEGAR, R. Hepatocyte growth factor. **Hepatology**, Baltimore, v. 15, p. 149-155, 1992.

MICHALOPOULOS, G. K.; DEFRANCES, M. C. Liver regeneration. **Science**, Washington, v. 276, p. 60-66, 1997.

NAGASUE, N.; YUKAYA, H.; OGAWA, Y.; KOHNO, H.; NAKAMURA, T. Human liver regeneration after major hepatic resection. A study of normal liver and livers with chronic hepatitis and cirrhosis. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 206, p. 30-39, 1987.

NAGAYOSHI, S.; KAWASHITA, Y.; EGUCHI, S.; KAMOHARA, Y.; TAKATSUKI, M.; MIYAMOTO, S.; MOCHIZUKI, S.; AKIHIKO, S.; TOKAI, H.; HIDAKA, M.; TAJIMA, Y.; KANEMATSU, T. Metabolism for cyclosporine A during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 14, n. 41, p. 6355-6359, 2008.

NAKAMURA, T.; ARAKAKI, R.; ICHIHARA, A. Interleukin-1 is a potent growth inhibitor of adult rat hepatocytes in primary culture. **Exp. Cell. Res.**, New York, v. 179, p. 488-497, 1988.

NOGUCHI, S.; OHBA, Y.; OKA, T. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. **J. Endocrinol.**, London, v. 128, p. 425-431, 1991.

OLSEN, P. S.; BOESBY, S.; KIRKEGAARD, P.; THERKEL-SEN, K.; ALMDAL, T.; POULSEN, S. S.; NEXO, E. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **Hepatology**, Baltimore, v. 8, p. 922-926, 1988.

OVERTURF, K.; AL-DHALIMY, M.; OU, C. N.; FINEGOLD, M.; GROMPE, M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 151, p. 1273-1280, 1997.

PEDDIADITAKIS, P.; LOPES-TAVALERA, J. C.; PETERSEN, B.; MONGA, S. P.; MICHALOPOULOS, G. K. The processing and utilization of hepatocyte growth factor / scatter factor following partial hepatectomy in the rat. **Hepatology**, Baltimore, v. 34, n.4, Pt 1, p. 688-693, 2001.

PONFICK, V. A. Ueber leberresection und leberreaction. **Verhandl Deutsch Gessellsch Chir.**, p. 19-28, 1890.

PROVENCHER, S. J.; DEMERS, C.; BASTIEN, M. C.; VILLENEUVE, J. P.; GASCON-BARRÉ, M. Selective effect of cyclosporine A on the early recovery of drug metabolism in the partially hepatectomized. **Hepatology**, Baltimore, v. 26, p. A382, 1997.

PROVENCHER, S. J.; DEMERS, C.; BASTIEN, M. C.; VILLENEUVE, J. P.; GASCON-BARRÉ, M. Effect of cyclosporine A on cytochrome P-450 mediated drug metabolism in the partially hepatectomized rat. **Drug Metab. Dispos.**, Stockholm, v. 27, n. 4, p. 449-455, 1999.

RALLI, E. P.; DUM, M. E. Simplified technique of partial hepatectomy in the rat with fat liver. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, Malden, v. 77, p. 188-190, 1951.

RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; ZUCOLOTO, S.; SILVA JR, O. C. Regeneração Hepática – algumas definições num universo de incertezas. **Acta Cir., Bras.**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 177-189, 1993.



RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; ZUCOLOTO, S.; SILVA JR, O. C. Regeneração hepática. In: SILVA JR, O. C.; ZUCOLOTO, S.; JÚNIOR, A. B. **Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia**, 1998. cap. 21, p. 244-258.

REPA, J. J. *et al.* Disruption of the sterol 27-hydroxylase gene in mice results in hepatomegaly and hypertriglyceridemia. Reversal by cholic acid feeding. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 275, p. 39685-3969, 2000.

RODRIGUEZ, G.; LORENTE, L.; DURAN, H. J.; ALLER, M. A.; ARIAS, J. A 70% hepatectomy in the rat using microsurgical technique. **Int. Surg.**, New York, v. 84, p. 135-138, 1999.

RUSSELL, W. E.; BUCHER, N. L. R. Vasopressin modulates regeneration in the Brattleboro rat. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 245, p. 321-324, 1983.

RUSSELL, W. E.; COFFEY, R. J.; QUELLETTE, A. J.; MOSES, H. L. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 85, p. 5126-5130, 1988.

SAWHNEY, N.; HALL, P. A. Ki-67 structure, function, and new antibodies. **J. Pathol.**, London, v. 168, p. 161-162, 1992.

SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, Cambridge, v. 103, p. 211-225, 2000.

SCHREM, H.; LUCK, R.; BECKER, T.; NASHAN, B.; KLEMPNAUER, J. Update on liver transplantation using cyclosporine. **Transplant. Proc.**, New York, v. 36, p. 2525-2531, 2004.

SCHULTE-HERMANN, R.; GRASL-KRAUPP; BURSCH, W. Apoptosis and hepatocarcinogenesis. In: JIRTLE, R. L. (Ed.). **Liver regeneration and carcinogenesis. Molecular and cellular mechanisms**. San Diego: Academic Press, p. 141-178, 1995.

SCHWALL, R. H. *et al.* Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro. **Hepatology**, Baltimore, v. 18, p. 347-356, 1993.

SELZNER, M.; CLAVIEN, P. A. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. **Hepatology**, Baltimore, v. 31, p. 35-42, 2000.

SHINOHARA, H.; SHIMADA, M.; OGASAWARA, T.; MORINE, Y.; IKEMOTO, T.; IMURA, S.; FUJII, M. Pharmacokinetics of cyclosporine A after massive hepatectomy: a hint for small-for-size graft in living donor liver transplantation. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v. 52, p. 2490-2496, 2007.

STARZL, T. E. *et al.* A hundred years of the hepatotrophic controversy. **Ciba Found. Symp.**, Amsterdam, p. 111-129, 1977.

STARZL, T. E. *et al.* The effect of splanchnic viscera removal upon canine liver regeneration. **Surg. Gynecol. Obstet.**, St. Louis, v. 147, p. 193-207, 1978.

STARZL, T. E. *et al.* Evolution of liver transplantation. **Hepatology**, Baltimore, v. 2, p. 614-636, 1982.

SVANAS, G. W.; EAGON, P. K.; ELM, M.; MAKOWKA, L.; PODESTA, L.; CHAPCHAP, P.; KAHN, D.; STARZL, T. E.; VAN THIEL, D. H. Effect of antiandrogen flutamide on measures of hepatic regeneration in rats. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v. 34, p. 1916-1923, 1989.

TAHARA, H. *et al.* Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 55, p. 2734-2736, 1995.

TAKAHASHI, T.; MALCHESKY, P. S.; NOSE, Y. Artificial liver. State of the art. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v. 36, p. 1327-1340, 1991.

TANAKA, N.; YAMAMOTO, H.; TATEMOTO, A.; URABE, T.; ORITA, K. Regulation of liver regeneration by interleukin-2 and its inhibitors: Cyclosporine A and FK 506. **Int. J. Immunopharmacol.**, Oxford, v. 15, p. 211-218, 1993.

TANNURI, A. C. A.; TANNURI, U.; COELHO, M. C. M.; MELLO, E. S.; SANTOS, N. A. S. R. Effects of immunosuppressants on hepatocyte cell mitosis during liver regeneration in growing animal models of partial hepatectomy. **Transplant. Proc.**, New York, v. 40, p. 1641-1644, 2008a.

TANNURI, U.; TANNURI, A. C. A.; COELHO, M. C. M.; MELLO, E. S.; SANTOS, N. A. S. R. Effect of the immunosuppressants on hepatocyte cells proliferation and apoptosis during liver regeneration after hepatectomy – molecular studies. **Pediatr. Transplant.**, Copenhagen, v. 12, p. 73-79, 2008b.

TANNURI, A. C. A.; TANNURI, U.; WAKAMATSU, A.; MELLO, E. S.; COELHO, M. C. M.; SANTOS, N. A. S. R. Effect of the immunosuppressants on hepatocyte proliferation and apoptosis in a young animal model of liver regeneration: An immunohistochemical study using tissue microarrays. **Pediatr. Transplant.**, Copenhagen, v. 12, p. 40-46, 2008c.

TARLÁ, M. R.; RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; CASTRO E SILVA, T.; BRANDÃO, D. F.; FERREIRA, J.; CASTRO E SILVA, O.; ZUCULOTO, S. A molecular view of liver regeneration. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 21, supl.1, p. 58-62, 2006.

THOMSON, A. W.; BONHAM, C. A.; ZEEVI, A. Mode of action of tacrolimus (FK 506): molecular and cellular mechanisms. **Ther Drug Monit.**, New York, v. 17, p. 584, 1995.

VAN THIEL, D. H. *et al.* Rapid growth of an intact human liver transplanted into a recipient larger than the donor. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 93, p. 1414-1419, 1987.

WEBBER, E. M.; BRUIX, J.; PIERCE, R. H.; FAUSTO, N. Tumor necrosis factor primes hepatocyte for DNA replication in the rat. **Hepatology**, Baltimore, v. 28, p. 1226-1234, 1998.

YAMADA, Y.; KIRILLOVA, I.; PESCHON, J. J.; FAUSTO, N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 28, p. 959-970, 1997.

YAMADA, A.; KAWATA, S.; TAMURA, S.; KISO, S.; HIGASHIYAMA, S.; UMESHITA, K.; SAKON, M.; TANIGUCHI, N.; MONDEN, M.; MATSUZAWA, Y. Plasma heparin-binding EGF-like growth factor levels in patients after partial hepatectomy as determined with an enzyme-linked immunosorbent assay. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 246, p. 783-787, 1998.

YASUDA, H. *et al.* Activin A: an autocrine inhibitor of initiation of DNA synthesis in rat hepatocytes. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 92, p. 1491-1496, 1993.

ZAKKO, W. F.; GREEN, R. M.; GOLLAN, J. L.; BERG, C. L. Hepatic regeneration is associated with preservation of microsomal glucuronidation. **Hepatology**, Baltimore, v. 24, n. 5, p. 1250-1255, 1996.

ZARNEGAR, R.; MICHALOPOULOS, G. K. Purification and biological characterization of human hepatopoietin A, a polypeptide growth factor for hepatocytes. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 49, p. 3314-3320, 1989.

ZIMMERS, T. A. *et al.* Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin-6 administration. **Hepatology**, Baltimore, v. 38, p. 326-334, 2003.

## APÊNDICES

APÊNDICE 1 – DADOS DOS PESOS DOS ANIMAIS NOS GRUPOS CONTROLE (C.24h e C.7d).

RATO	Peso pré-op. (g)	Peso na hepatectomia (g)	Peso no 2º PO (g)	Peso no 4º PO (g)	Peso na eutanásia (g)	Variação do peso (g)
C.24h 1	489,5	497	-	-	455,6	33,9
C.24h 2	445,2	426,1	-	-	420,7	24,4
C.24h 3	507,3	484,8	-	-	477,2	30,1
C.24h 4	431,8	416,8	-	-	406,1	25,7
C.24h 5	485,7	467,9	-	-	448,3	37,4
C.24h 6	493,1	471,2	-	-	447,5	45,6
C.24h 7	510,1	479,7	-	-	465,6	44,5
C.24h 8	507,1	488,5	-	-	476,3	30,8
C.24h 9	524,5	498,8	-	-	480,1	44,4
C.24h10	559,8	530,2	-	-	512	47,8
C.7d 1	483,4	464,8	441,5	448,9	439,9	43,5
C.7d 2	501,1	477,1	464,9	454,1	441,2	59,9
C.7d 3	517,4	500,5	457	466,8	450,8	66,6
C.7d 4	559	531,6	495,1	512,2	498,6	60,4
C.7d 5	527,8	522,5	509,5	509	497,1	30,7
C.7d 6	517,6	507,4	491,5	493,4	484,3	33,3
C.7d 7	549,1	536,3	523	514	506,8	42,3
C.7d 8	544,3	536,6	514,9	514	500	44,3
C.7d 9	534,8	523,3	511,2	504	496,8	38
C.7d 10	512,7	505,1	500,1	499	473,5	39,2

**Variação do peso (g):** variação entre as médias dos pesos corporais pré-operatório e na eutanásia.

## APÊNDICE 2 – DADOS DOS PESOS DOS ESPÉCIMES NOS GRUPOS CONTROLE (C.24h e C.7d).

<b>RATO</b>	<b>Peso do explante 70% (g)</b>	<b>Peso do fígado remanescente (g)</b>	<b>Peso total do fígado (g)</b>	<b>Peso do fígado na eutanásia (g)</b>
C.24h 1	8,9	3,8	12,7	7,1
C.24h 2	7,5	3,2	10,7	6,5
C.24h 3	8,5	3,6	12,1	7,4
C.24h 4	7,2	3,1	10,3	6,4
C.24h 5	9,1	3,9	13,1	7,6
C.24h 6	9,0	3,8	12,8	7,7
C.24h 7	8,3	3,5	11,8	6,9
C.24h 8	10,1	4,3	14,5	8,3
C.24h 9	8,9	3,8	12,8	7,5
C.24h 10	9,5	4,1	13,6	7,3
C.7d 1	7,5	3,2	10,7	9,9
C.7d 2	7,9	3,4	11,2	9,9
C.7d 3	7,8	3,3	11,1	8,7
C.7d 4	10,4	4,4	14,8	9,9
C.7d 5	9,5	4,1	13,6	9,8
C.7d 6	8,3	3,6	11,9	9,1
C.7d 7	10,1	4,3	14,4	10,0
C.7d 8	9,7	4,2	13,9	8,8
C.7d 9	9,1	3,9	13,0	11,0
C.7d 10	8,8	3,8	12,6	11,8

**Explante 70% = Hepatectomia 70%; Fígado remanescente = 30%; Peso total = 100%**

## APÊNDICE 3 – DADOS DOS PESOS DOS ANIMAIS NOS GRUPOS ESTUDO (E.24h e E.7d).

RATO	Peso pré-op. (g)	Peso na hepatectomia (g)	Peso no 2º PO (g)	Peso no 4º PO (g)	Peso na eutanásia (g)	Variação do peso (g)
E.24h 1	535,0	505,0	-	-	492,0	43,0
E.24h 2	585,0	560,0	-	-	537,0	48,0
E.24h 3	487,0	469,0	-	-	450,0	37,0
E.24h 4	570,0	552,0	-	-	526,0	44,0
E.24h 5	495,0	473,0	-	-	458,0	37,0
E.24h 6	506,0	468,8	-	-	456,9	49,1
E.24h 7	481,3	459,0	-	-	442,9	38,4
E.24h 8	490,0	470,0	-	-	448,3	41,7
E.24h 9	547,1	517,6	-	-	493,2	53,9
E.24h10	505,2	479,3	-	-	463,9	41,3
E.7d 1	561,1	550,6	519,0	515,2	501,6	59,5
E.7d 2	449,0	439,5	410,0	405,5	389,5	59,5
E.7d 3	495,0	482,5	445,0	440,3	418,5	76,5
E.7d 4	512,0	503,7	475,0	465,7	446,3	65,7
E.7d 5	462,0	455,3	428,0	419,6	411,8	50,2
E.7d 6	530,4	515,5	494,7	492,2	482,5	47,9
E.7d 7	481,6	466,0	441,9	431,1	432,3	49,3
E.7d 8	543,0	521,1	501,1	498,0	477,8	65,2
E.7d 9	464,2	445,5	429,7	436,4	426,5	37,7
E.7d 10	418,9	409,2	385,1	379,6	375,2	43,7

**Variação do peso (g):** variação entre as médias dos pesos corporais pré-operatório e na eutanásia.

## APÊNDICE 4 – DADOS DOS PESOS DOS ESPÉCIMES NOS GRUPOS ESTUDO (E.24h e E.7d).

<b>RATO</b>	<b>Peso do explante 70% (g)</b>	<b>Peso do fígado remanescente (g)</b>	<b>Peso total do fígado (g)</b>	<b>Peso do fígado na eutanásia (g)</b>
E.24h 1	8,1	3,5	11,6	5,8
E.24h 2	10,6	4,5	15,1	8,5
E.24h 3	8,6	3,7	12,3	6,1
E.24h 4	10,9	4,7	15,6	8,2
E.24h 5	8,2	3,5	11,7	8,7
E.24h 6	7,3	3,1	10,5	6,6
E.24h 7	7,2	3,1	10,2	6,4
E.24h 8	7,7	3,3	11,0	7,5
E.24h 9	9,3	4,0	13,3	6,7
E.24h10	8,3	3,6	11,9	7,9
E.7d 1	11,5	4,9	16,4	12,4
E.7d 2	8,0	3,4	11,5	8,5
E.7d 3	9,2	3,9	13,1	10,1
E.7d 4	9,0	3,8	12,8	10,1
E.7d 5	7,3	3,1	10,5	9,6
E.7d 6	8,3	3,6	11,9	9,7
E.7d 7	7,5	3,2	10,6	9,3
E.7d 8	7,9	3,4	11,3	10,9
E.7d 9	7,7	3,3	11,0	10,9
E.7d 10	8,1	3,5	11,6	9,9

**Explante 70% = Hepatectomia 70%; Fígado remanescente = 30%; Peso total = 100%**

**APÊNDICE 5 – DADOS DOS DIFERENTES MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO  
HEPÁTICA NOS GRUPOS CONTROLE (C.24h e C.7d).**

<b>RATO</b>	<b>Fórmula de Kwon (%)</b>	<b>Índice Mitótico – HE (células/10CGA)</b>	<b>Ki-67 (células positivas/100 células)</b>	<b>PCNA (células positivas/100 células)</b>
C.24h 1	60,55	0	47	79
C.24h 2	61,35	0	97	61
C.24h 3	62,00	1	63	90
C.24h 4	63,82	0	71	97
C.24h 5	60,93	0	62	57
C.24h 6	62,87	0	75	54
C.24h 7	60,57	0	47	71
C.24h 8	59,12	0	27	69
C.24h 9	60,55	2	41	39
C.24h10	55,47	0	53	57
C.7d 1	96,98	3	61	71
C.7d 2	95,32	1	17	27
C.7d 3	86,88	0	39	29
C.7d 4	71,32	0	32	39
C.7d 5	75,77	5	71	87
C.7d 6	79,57	2	68	47
C.7d 7	72,86	2	38	49
C.7d 8	68,60	3	26	73
C.7d 9	89,15	1	43	76
C.7d 10	99,60	2	52	81

**Fórmula de Kwon:** expressa em % a regeneração; **Índice mitótico:** número de núcleos em mitose em 10 CGA; **Ki-67:** número de núcleos positivos em 100 hepatócitos registrados; **PCNA:** número de núcleos positivos em 100 hepatócitos registrados.



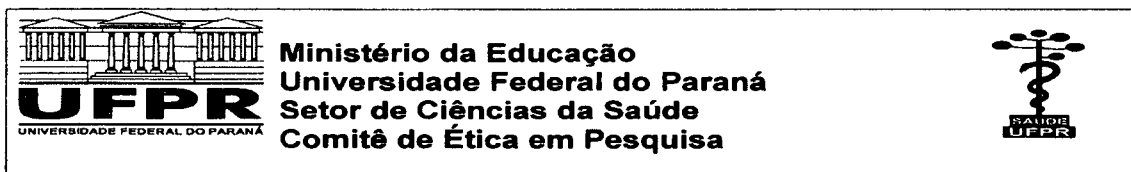
APÊNDICE 6 – DADOS DOS DIFERENTES MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA NOS GRUPOS ESTUDO (E.24h e E.7d).

RATO	Fórmula de Kwon (%)	Índice Mitótico – HE (células/10CGA)	Ki-67 (células positivas/100 células)	PCNA (células positivas/100 células)
E.24h 1	51,80	1	12	83
E.24h 2	58,40	0	81	91
E.24h 3	52,10	0	37	51
E.24h 4	55,00	1	67	53
E.24h 5	76,40	1	75	69
E.24h 6	65,02	1	82	77
E.24h 7	67,60	0	87	71
E.24h 8	74,55	0	77	83
E.24h 9	55,97	0	81	85
E.24h10	72,46	1	53	80
E.7d 1	82,88	0	10	17
E.7d 2	83,90	1	12	19
E.7d 3	89,29	2	27	41
E.7d 4	88,97	4	19	31
E.7d 5	101,30	1	13	40
E.7d 6	87,88	4	79	51
E.7d 7	94,30	2	71	61
E.7d 8	105,10	0	61	51
E.7d 9	103,22	0	63	57
E.7d 10	93,64	2	60	55

**Fórmula de Kwon:** expressa em % a regeneração; **Índice mitótico:** número de núcleos em mitose em 10 CGA; **Ki-67:** número de núcleos positivos em 100 hepatócitos registrados; **PCNA:** número de núcleos positivos em 100 hepatócitos registrados.

## ANEXOS

### ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPR.



Curitiba, 09 de agosto de 2007.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**Giorgio Alfredo Pedroso Baretta**  
Nesta

Prezado(a) Senhor(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **“Efeito da Ciclosporina na regeneração hepática em ratos submetidos à hepatectomia parcial”** obedece os Princípios Éticos da Experimentação Animal, estabelecidos e aprovados em documento orientados, expedido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR em reunião realizada no dia 01 de agosto de 2007 e apresentou pendências. Documentos analisados, depois de atendidas as pendências, e projeto aprovado em 09 de agosto de 2007.

Registro **CEP/SD: AN.007.003.07.07**

**Data para entrega do relatório final ou parcial: 09/02/2008.**

Atenciosamente



**Prof.ª Dr.ª Liliانا Maria Labronici**  
Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Prof.ª Dr.ª Liliانا Maria Labronici  
Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisa - SD/UFPR

**ANEXO 2 – COMPOSIÇÃO BÁSICA DA RAÇÃO BALANCEADA FORNECIDA AOS RATOS (NUVILAB CR1®)**

Carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico, aminoácidos (DL-metionina e lisina).
Umidade (máximo): 12,5%
Proteína bruta (mínimo): 22%
Cálcio (máximo): 1,4%
Fósforo (mínimo): 0,8%
Estrato etéreo (mínimo): 4%
Material mineral (máximo): 10%
Matéria fibrosa (máximo): 8%
Vitaminas: A, D3, E, K3, B1, B2, B6, B12, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina, colina.
Microelementos: ferro, zinco, cobre, iodo, manganês, selênio, cobalto.

FONTE: Nuvital Nutrientes, Colombo, PR, Brasil